

Betydning av paternell
akrylamideksponering for utvikling
av det befruktede egget

av Salma Shahzadi

Masteroppgave i Toksikologi
Program for integrativ biologi
Biologisk institutt
Universitetet i Oslo
Desember 2008

FORORD

Arbeidet presentert i denne oppgaven ble utført ved Avdeling for kjemikalietoksikologi, Divisjon for miljømedisin, Folkehelseinstituttet, i en periode fra 01.2007 til 12.2008 for å oppnå en mastergrad i toksikologi. Min hovedveileder har vært forsker Birgitte Lindeman PhD, og min medveileder har vært stipendiat Ville Erling Sipinen. Professor Kjetil Dag Eriksen Hylland PhD ved Program for integrativ biologi, Biologisk institutt, Universitetet i Oslo, har vært min interne veileder.

Birgitte Lindeman har en lager av kunnskap, tålmodighet, og ikke minst optimisme som har gjort denne oppgaven mulig. Hjertelig takk for masse hjelp, støtte og for å ha vært den perfekte veilederen. På grunn av deg har jeg klart å jobbe med masteroppgaven, selv med mange nedganger. Jeg vil alltid se opp til deg.

Jeg vil takke Ville Erling Sipinen for masse hjelp med kometmetoden. Mange takk til forsker Asgeir Brevik PhD for all hjelp, oppmuntring og støtte underveis. Takk til Professor Kjetil Dag Eriksen Hylland for god veiledning.

Takk til avdelings direktør Gunnar Brunborg PhD. Jeg vil takke alle medhjelpere fra Rikshospitalet, Oslo, og alle sammen på vår avdeling. Vil spesielt takke stipendiat Siri Helland Hansen for hjelp, og omtenkksomhet. Takk til min medstudent, Heidi Nyland for å ha vært en god venn.

Jeg hedrer min mor, hun klarte å våkne 11 dager etter en hjertestand på 1 time og 20 minutter. Hun ville at jeg skulle oppnå min mastergrad og gjøre henne stolt. Ammi jeg elsker deg. Takk til abba ji, min søster, Nighat Shahzadi, og ikke minst min kjære mann, Kamran Ul-Haq for all støtte og kjærighet. Glad i dere!

INNHALDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	3
SUMMARY	5
FORKORTELSER	7
1. INNLEDNING	9
1.1 Generell bakgrunn	9
1.2 Akrylamid (AA)	10
1.2.1 Forekomst	10
1.2.2 Human eksponering	10
1.2.3 Akrylamid toksikokinetikk	12
1.2.4 Akrylamids toksisitet	14
1.2.4.1 Toksisitet og bindingsaffinitet	14
1.2.4.2 Paternell toksisitet	15
1.3 Hannens reproduksjonssystem	18
1.3.1 Testiklene	18
1.3.2 Spermatogenesisen	19
1.3.2.1 Spermatogoniesen	20
1.3.2.2 Meiosen og spermiogenesisen	21
1.3.2.3 Spermiering og tap av spermceller	21
1.4 Hunnens reproduksjonssystem	23
1.4.1 Oogenese	23
1.5 Fertilisering	25
1.5.1 Spermcellen	26
1.5.1.1 DNA-pakking i spermceller	26
1.5.2 DNA-skaderesponser i embryo	29
1.5.2.1 Histon-proteinet H2AX	30
1.5.2.2 Tumorsupressorproteinet p53	31
1.6 DNA-reparasjon	31
1.6.1 Baseeksisjonsreparasjon (BER)	33
1.6.2 Fpg (Formamidopyrimidin DNA-glykosylase)	34
1.6.3 Metoder for å måle DNA-skade i spermceller	35
1.7 Målsettinger for oppgaven	37
2. MATERIALER OG METODER	38
2.1 Mus	38
2.2 Eksponering og isolering av spermceller	39
2.3 Kometmetoden	40
2.3.1 Kometmetoden brukt på spermceller	41
2.3.1.1 Bruk av Formamidopyrimidin DNA-glykosylase (Fpg) i kometmetoden	43
2.3.2 Skåring av kometer	44
2.4 SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)	45
2.5 <i>In vitro</i> fertilisering	46
2.6 Immunfarging av oocytter	49
2.6.1 Analyse av immunfargete celler	50
2.7 Statistiske metoder	50
3. RESULTATER	53
3.1 Optimalisering av kometmetoden for måling av DNA-skader i musesperm	53

INNHALDSFORTEGNELSE

3.2	Seine spermatider og tidlig spermatozoer gir opphav til størst DNA-skade i sperm etter akrylamid-eksponering	55
3.3	Dannelse av oksidative DNA-skader etter akrylamid-eksponering.	57
3.4	Effekter på tidlig embryoutvikling	60
3.5	DNA-skaderesponsproteiner i embryoer fertilisert med akrylamid-eksponert sperm. ..	62
4.	DISKUSJON	66
4.1	Måling av DNA-skader i sperm	66
4.1.1	Optimalisering av kometmetoden for måling av DNA-skader i musesperm	67
4.2	Stadier i spermatogenesisen som er assosiert med høyest nivå av DNA-skader i sperm etter akrylamid-eksponering	70
4.3	Dannelse av oksidative DNA-skader etter akrylamid-eksponering	72
4.4	Effekter på tidlig embryoutvikling	73
4.5	DNA-skaderesponsproteiner i embryoer fertilisert med akrylamid-eksponert sperm ...	75
5.	KONKLUSJON	77
6.	REFERANSER	78
7.	VEDLEGG	XC

SAMMENDRAG

Ufrivillig barnløshet rammer mange par, og ikke velfungerende spermceller er en vanlig årsak. DNA-skader i spermceller kan føre til redusert mannlig fertilitet, og påvirke utvikling av et befruktet embryo. I denne masteroppgaven studeres akrylamid (AA)-induserte DNA-skader i spermceller, og hvordan slike skader påvirker utvikling av embryoer under de første celledelingene.

AA er et stoff som dannes under varmebehandling av stivelsesrike matvarer, som gjør at den generelle befolkningen eksponeres for dette stoffet daglig. I kroppen metaboliseres AA til epoksidet, glycidamid (GA), som man antar er den viktigste toksiske metabolitten. AA og GA har vist negative effekter på reproduksjon hos hannmus inkludert paternelle effekter på overlevelse av tidlige embryoer. Stoffene binder kromatin i differensierte mannlige kjønnsceller. På grunn av lav reparasjonsevne i seine stadier av spermatogenesis vil DNA-skader som introduseres ikke bli fjernet, og vil dermed kunne bli overført til embryoet ved fertilisering.

I denne oppgaven har vi undersøkt hvilke stadier i spermatogenesis som gir opphav til høyest nivå av DNA-skade i mus sperm etter *in vivo* AA-eksponering. Det er utfordrende å måle DNA-skader i spermceller fordi spermkromatin er svært tettpakket. Derfor ble arbeidet med å optimalisere den såkalte kometanalysen for å måle AA-induserte DNA-skader i sperm. I tillegg til kometmetoden benyttet vi oss av SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay). Vi målte høyest DNA-skade i sperm 7 dager etter *in vivo* eksponering, som tilsier at skaden har oppstått i seine spermatider og tidlige spermatozoer. Kometmetoden ble kombinert med Formamidopyrimidin DNA-glykosylase (Fpg) for å detektere mulige oksidative skader i sperm. Bruk av Fpg viste en signifikant økning i skadenivå målt i spermceller eksponert for GA *in vitro*, men ingen økning i *in vivo* forsøkene med AA. Sperm isolert 7 dager etter AA-eksponering ble brukt til å befrukte oocytter fra ueksponerte hunnmus *in vitro*. Det ble ikke observert endringer i befruktningsrate ved fertilisering med eksponert sperm. Imidlertid var det indikasjoner på endret celledelingsrate i tidlige embryoer fra eksponert far. To- og 4-cellede embryoer ble immunfarget for DNA-skaderesponsproteinene, γ H2AX og tumorsuppressorprotein p53. Immunfarging antyder et høyere uttrykk av γ H2AX i embryoer fra eksponert far, sammenlignet med kontroll. Våre preliminnære data på p53 viser dannelse av foci i embryoer fra eksponert far.

Sammenlagt har denne oppgaven gitt en forbedret kometmetode, som er følsom nok til å måle AA-induserte DNA-skader i musesperm. Våre resultater viser at AA-eksponering fører til DNA-skade i hele spermpopulasjonen, og ikke bare i en subpopulasjon. Eksponering av seine spermatider og tidlige spermatozoer gir det høyest målte nivået av DNA-skader i sperm. Videre viser vi at AA-eksponert sperm kan påvirke celledelingshastigheten i det tidlige embryoet, og at sentrale DNA-skade-responser trolig blir aktivert. Oppgaven bidrar med å utvikle et batteri av metoder som kan benyttes for å studere cellulære mekanismer som ligger til grunn for kjemikalieindusert paternell embryotoksisitet.

SUMMARY

Infertility affects many couples, and dysfunctional sperm is a common cause. DNA damage in sperm cells can cause reduced male fertility, and effect development of a fertilized embryo. In this thesis we have studied acrylamide (AA) induced DNA damage in sperm cells, and how they contribute to development of embryos during the first two cleavages.

AA is a compound that is formed during cooking of starchy food products, this lead to daily exposure of this compound in the general population. In the body AA is metabolised to its epoxide, glycidamide (GA), which is assumed to be the most important toxic metabolite. AA and GA have shown negative effects on reproduction in male mouse and paternally mediated embryo toxicity has been observed. The substances bind to chromatin in differentiated male germ cells. Due to low repair capacity in late stages of spermatogenesis, DNA damage that is introduced will not be removed, and therefore can be transmitted to the embryo by fertilization.

In this thesis we have investigated which stages during spermatogenesis that gives rise to highest level of DNA damage in mouse sperm after *in vivo* AA exposure. It is challenging to measure DNA damages in sperm cells because of the compact nature of sperm chromatin. Therefore we worked to optimise the so-called comet assay to measure AA induced DNA damage in sperm. In addition to comet assay we used Sperm Chromatin Structure assay (SCSA). Our results show maximum DNA damages in sperm 7 days after *in vivo* exposure, indicating that the damage occurs in late spermatids and early spermatozoa. Comet assay combined with Formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) was used to detect possible oxidative lesions in sperm. Use of Fpg showed significant increase in level of DNA damage measured in sperm cells exposed to GA *in vitro*, but this increase was not detected in *in vivo* experiments with AA. Sperm isolated 7 days after AA exposure was used to fertilize oocytes from unexposed female mouse *in vitro*. There were no observed differences in fertilisation rates between exposed and unexposed sperm. However, there were indications of changed cell division rates in early embryos from exposed father. Two and 4 cells embryos were analysed after immune fluorescence stained for DNA damage response proteins, γ H2AX and tumor suppressor protein p53. Immune fluorescence staining indicates a higher expression of γ H2AX in embryos from exposed father, compared with control. Preliminary data on the expression of p53 shows formation of nuclear foci in embryos from exposed father.

In summary, this thesis describes an improved comet assay, sensitive enough to measure AA induced DNA damage in mouse sperm. Our results show that AA exposure lead to increased DNA damage in the entire sperm population, and not only in a subpopulation of exposed sperm. Exposure of late spermatids and early spermatozoa give maximum measured DNA damage in sperm. Further we show that AA exposed sperm can affect cell division rate in the early embryo, and important DNA damage responses seem to be activated. This thesis contributes with the establishment of a battery of assays, which can be used to study cellular mechanisms behind chemical induced paternally mediated embryo toxicity.

FORKORTELSER

8-oksoguanin	8-okso-7, 8-dihydroguanin
A	Adenin (2'-deoksyadenosin 5'-trifosfat)
AA	Akrylamid
AO	Akridinorange
AP-sete	Apyrimidin-/Aapurin-sete
BER	Baseeksisjonsreparasjon
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosine (2'-deoksycytidin 5'-trifosfat)
CYP	Cytokrom P-450
dH ₂ O	Destillert vann
DNA	Deoksyribonuklein syre
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Etylendinitrilotetraeddiksyre, dinatrium salt
EU	Europeiske Unionen
FISH	Fluoroserende in situ hybridisering
Fpg	Formamidopyrimidin DNA-glykosylase
GA	Glycidamid
G	Guanin (2'-deoksyguanosin 5'-trifosfat)
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
IVF	<i>In vitro</i> fertilisering
LIS	Lithium 3, 5-diiosalicylate
LPR	Long-patch repair,
MIKT	Avdeling for kjemikalie toksikologi
MMS	Methyl Metansulfonat
NER	Nucleotideksisjonsreparasjon
NOEL	No observed effect level
OGG1	8-oksoguanin DNA-glykosidase 1
PBS	Fosfatbufret saltvann
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
P/S	Penicillin/ Streptomycin
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
SPR	Short-patch repair
SSB	Enkeltrådbrudd

FORKORTELSER

T	Thymin (2'-deoksytymidin 5'-trifosfat)
Tri	Trizma®base
Tris-HCl	Trizma Hydroklorid
WHO	World Health Organization
WT	Villtype

1. INNLEDNING

1.1 Generell bakgrunn

Det er kjent at ufrivillig barnløshet påvirker mange par i Europa, og dårlig spermkvalitet en vanlig årsak (Jørgensen, Andersen et al. 2001). Det er godt dokumentert at miljøgifter kan skade mannens reproduksjonsevne ved å forårsake spesifikke genetiske forandringer i sperm (Ni, Liu et al. 1997; Lopes, Jurisicova et al. 1998; Irvine, Twigg et al. 2000). Flere studier viser at aberrasjoner i spermkromatin reduserer menns fertilitet (Agarwal og Said 2003; Suganuma, Yanagimachi et al. 2005), og defekter i DNA-reparasjon har negativ påvirkning på mannlig fertilitet (Paul, Melton et al. 2008). Til tross for omfattende DNA-skader beholder spermcellen evnen til å befrukte et egg (Ni, Liu et al. 1997; Lopes, Jurisicova et al. 1998; Irvine, Twigg et al. 2000). Spermceller med massive DNA-skader kan danne forkjerner i oocytter (Twigg, Irvine et al. 1998). Når sperm med DNA-skader befrukter et egg kan resultatet bli unormal utvikling av zygoten, eller arrest i zygoteutvikling. Dette kan resultere i abort, misdannelser og sykdommer, inkludert kreft hos avkommet (Ahmadi og Ng 1999b; Zenzes et al., 1999; Brinkworth, 2000).

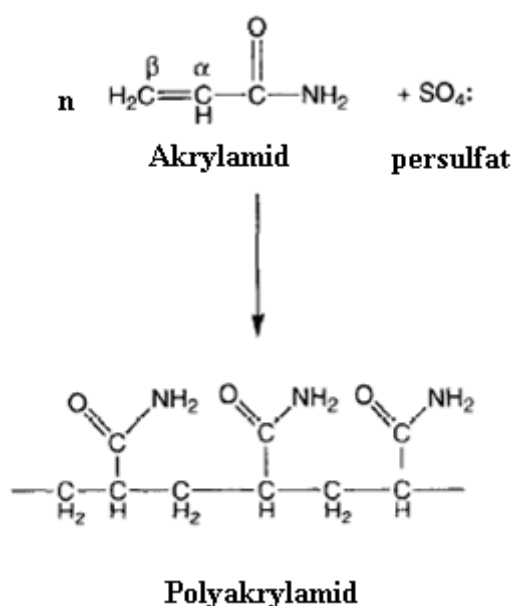
Dyreforsøk har bidratt med viktig informasjon om mulige reproduktive effekter av akrylamid (AA). Allerede i 1986 ble det gjort studie av AA-effekter på reproduksjon hos mus (Sakamoto og Hashimoto 1986). Ved parring mellom AA-eksponerte hanner og ikke-eksponerte hunner ble det observert en tydelig reduksjon i fertilitetsraten, mens ved parring mellom ubehandlede hanner med behandlede hunner ble det ikke observert effekter på fertilitetsraten. Hanner hadde redusert spermantall og økt andel spermceller med unormal morfologi. Begge disse parameterne bidrar til redusert fertilitet. Samlet viser studiet at hunner virker mer resistente ovenfor reproduksjonstoksiske effekter av AA (Sakamoto og Hashimoto 1986). I ettertid har andre studier vist at AA-eksponering av hannmus kan føre til skader på embryoutvikling. Slike skader omfatter blant annet morfologiske forstyrrelser, kromosomale avvik, dannelse av mikrokjerner, redusert utvikling og eventuelt tap av embryo (Marchetti, Lowe et al. 1997; Titenko-Holland, Ahlborn et al. 1998; Holland, Ahlborn et al. 1999).

Interessen for mulige negative effekter av AA hos mennesker økte betraktelig etter at det ble kjent at dette stoffet dannes under varmebehandling av stivelsesrike matvarer (Tareke, Rydberg et al. 2002). I den generelle befolkningen er mat hovedkilden til AA-eksponering (Dybing og Sanner 2003; Svensson, Abramsson et al. 2003).

1.2 Akrylamid (AA)

1.2.1 Forekomst

Akrylamid (AA) har vært i produksjon siden 1950. Stoffet er en lavmolekylvekt vinylkomponent, med en α , β – umettet dobbeltbinding (**Figur 1.1**), som ligger til grunn for mye av aktiviteten til stoffet. Denne farge- og luktløse krystallsubstansen er meget vannløselig, og er reaktiv i luft og kan danne polymerer. AA-polymerer brukes mye i moderne kjemisk teknologi for forskjellige formål. Disse formålene inkluderer blant annet jordstabilisering i veibygging, bruk i papir, tekstil og i kosmetiske produkter oppsummert i oversiktsartikler av Friedman 2003 og Besarantinia og Pfeifer 2007. Det er kjent at AA forekommer i vanlige matvarer og snacks som pommes frites, potetgull, knekkebrød, brød, kjeks og kaffes (Tareke, Rydberg et al. 2002; Svensson, Abramsson et al. 2003).



Figur 1.1 Struktur av akrylamid. Akrylamid har dobbeltbinding mellom α - og β -karbon, og kan derfor lett danne polymerer. Modifisert figur (Dearfield, Douglas et al. 1995).

1.2.2 Human eksponering

Human eksponering av akrylamid (AA) er kompleks. Eksponering for AA kan skje gjennom produksjon og bruk. Andre kilder er via vannbehandling, sigarettøyk, mat og via polyakrylamid-geler i fugemasse og i laboratoriearbeid hvor det blir brukt i kromatografi og elektroforese for separasjon og isolering av blant annet proteiner (oppsummert i Doerge, Young et al. 2005). Mennesker eksponeres for AA via flere opptaksveier (gjennom huden, via

inhalasjon, fra drikkevann og mat) (oversiktsartikkel av Friedman 2003). Måling av AA-hemoglobin-addukter i blod (Bergmark et al. 1993) eller utskilte AA-deriverte urinmetabolitter (Bjellaas et al. 2005) kan være gode biomarkører for estimering av individers AA-eksponering.

For den generelle befolkningen er inntak av vanlige matvarer som nevnt over den største eksponeringskilden. Røykere blir ytterligere eksponert for AA (Bergmark 1997). Dannelsen av AA i mat avhenger hvordan mat tilbrederes, og hva slags mat som tilbredes (Becalski, Lau et al. 2003). Det er observert at AA ikke dannes i ubehandlet eller kokt mat, mens det dannes moderate mengder AA (5-50µg/kg) under varmebehandling av proteinrikmat, og høye mengder (150-4000µg/kg) ved tilberedning av stivelsesrik mat (Tareke, Rydberg et al. 2002).

En mekanisme for AA-dannelse i mat er via den såkalte Maillard-reaksjonen. Dette er en bruningsreaksjon som skjer når mat stekes eller varmebehandles ved høye temperaturer. Reaksjonen involverer aminosyren asparagin og en karbonylkilde, ofte sukker (Stadler et al. 2002; Vatter og Shetty 2003; Zyzak et al. 2003).

Mattilsynet har analysert 30 forskjellige matprodukter og åtte kaffetyper fra det norske markedet (Dybing og Sanner 2003). Analysene viser at potetgull og potetgull innholder høye mengder av AA. I en undersøkelse gjort av NORKOST (Johansson og Solvoll 1997) ble en norsk befolkningsgruppe (1291 men og 1381 kvinner mellom 16-79 år) spurt om sine spisevaner. Basert på denne undersøkelsen viser Dybing og Sanner at menn får i seg mer AA gjennom maten enn kvinner (Dybing og Sanner 2003). Det er estimert at gjennomsnittlig daglig inntak av AA er 38 µg for men og 29 µg for kvinner, noe som tilsvarer 0,49 µg/kg kroppsvekt/dag hos men, og 0,46 µg/kg kroppsvekt/dag hos kvinner (**Tabell 1-1**).

Tabell 1-1: Estimert inntak av akrylamid (kilde NORKOST 1997) (Dybing og Sanner 2003).

Parameter	Menn µg/dag	Kvinner µg/dag	Men µg/kg kroppsvekt/dag	Kvinner µg/kg kroppsvekt/dag
Gjennomsnitt	38	29	0,49	0,46
Median	29	24	0,41	0,42

Tabell 1-2 viser bidraget fra forskjellige matvarer til estimert inntak av AA presentert i tabell 1-1. Kaffe utgjør mest av bidraget (28 %), etterfulgt av potetgull som utgjør nesten 18 %. Dybing og Sanner viser at inntaket blant 13 åringer er 4-5 ganger høyere enn gjennomsnittlig inntak, her er potetgull hovedkilden etterfulgt av kjeks (Dybing og Sanner 2003). En annen undersøkelse gjort i Sverige viser også at unge voksne (18-34 år) får i seg langt mer AA gjennom snacks enn eldre (Svensson, Abramsson et al. 2003). Slike undersøkelser tydeliggjør at eksponeringskilden og nivået av AA avhenger folks spisevaner.

Tabell 1-2: Bidrag fra forskjellige matvarer til estimert inntak av akrylamid (Dybing og Sanner 2003).

Matvare	Menn gjennomsnittliginntak 38 µg/dag	Kvinner gjennomsnittliginntak 29 µg/dag
Myk brød	13 %	11.9 %
Brød, annet	7.7 %	12.2 %
Kjeks	5.0 %	5.9 %
Potet fries	7.5 %	6.3 %
Frech fries	8.0 %	6.3 %
Potet gull	17.6 %	17.4 %
andre snacks	5.0 %	4.6 %
Kaffe	28.0 %	28.6 %
Annet	8.2 %	6.8 %

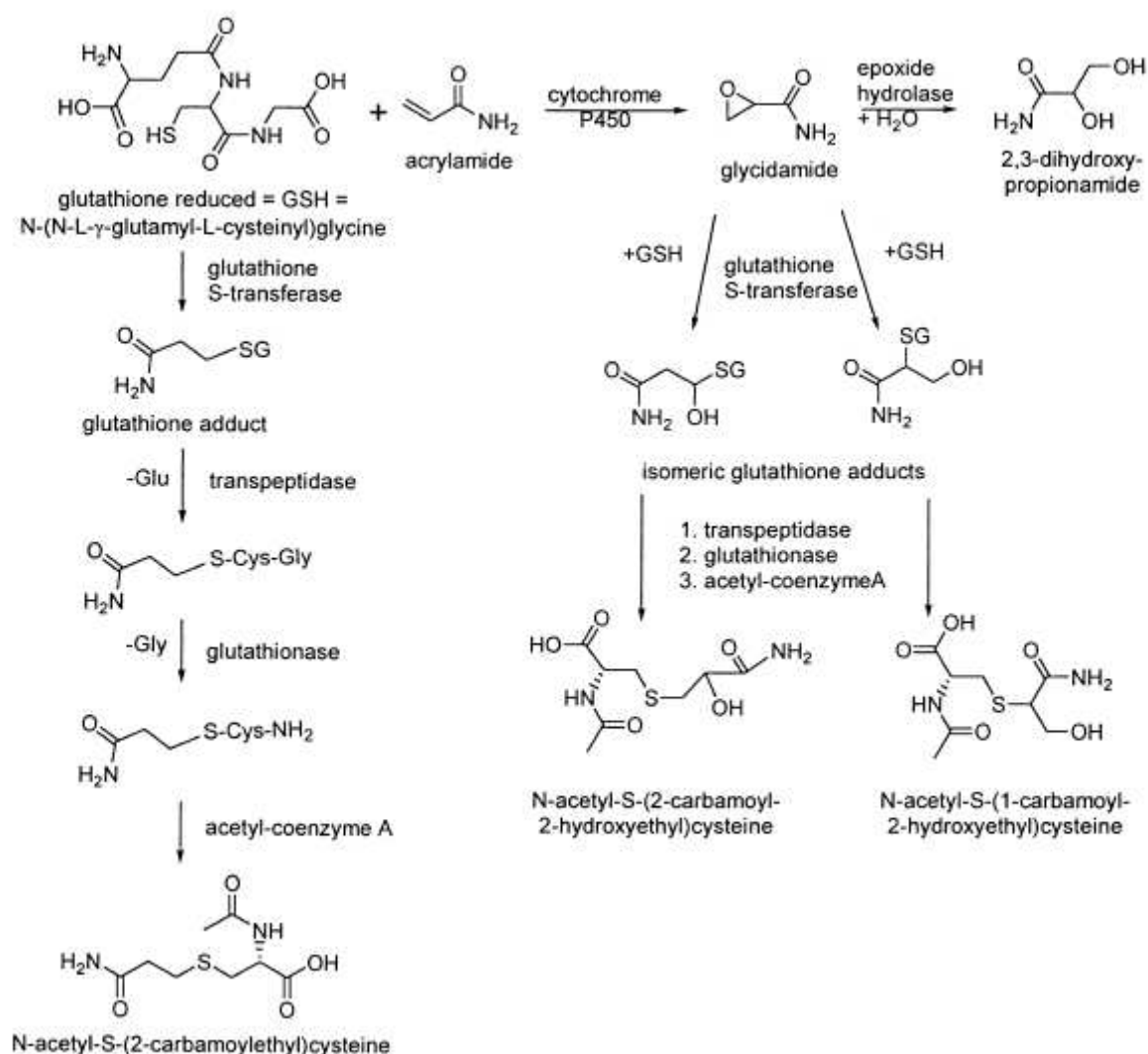
Den Europeiske Unionen (EU) har satt en grenseverdi på 0,1 mikrogram/liter akrylamid (AA) i vann, som gjelder fra og med desember 2003, men det finnes ingen grenseverdi for AA i mat (Swedish National Food Agency 2008).

1.2.3 Akrylamid toksikokinetikk

Det er kjent at akrylamid (AA) tas raskt opp i kroppen via lunge, mage/tarm eller ved hudkontakt, og at enten stoffet selv, eller metabolitter av det fordeler seg i store deler av kroppen (Goffeng, Kjuus et al. 2002). Et klinisk studie viser at mesteparten av en AA-dose (0,94 mg) gitt oralt til mennesker absorberes raskt (Fuhr, Boettcher et al. 2006). I kliniske studier har man gitt opptil 3 mg/kg AA til frivillige (ofte via mat), dette er metabolisme- og kinetikkstudier (Fennell, Summer et al. 2005; Fennell, Sumner et al. 2006; Fuhr, Boettcher et al. 2006). 3 mg/kg er en mye lavere dose enn de ofte brukt i dyreforsøk. Ofte er forsøksdosene mye høyere enn mengdene på få µg/dag som den generelle befolkningen eksponeres for via mat (Dybing og Sanner 2003).

Dyreforsøk har vist at AA metaboliseres hovedsakelig i leveren, om lag 50 % av oralt administrert AA metaboliseres i leveren (Sumner, MacNeela et al. 1992). Den mest kjente

metabolitten av AA er epoksidet glycidamid (GA). Metabolismen involverer enzymet cytokrom P450 2E1 (CYP2E1), og det foreslås høyere innhold av dette enzymet hos mennesker enn hos gnagere (Sumner, Fennell et al. 1999). Kinetikk-studier viser at epoksidering av AA til GA følger Michaelis-Menten-kinetikk. Denne omgjøringen mettes når konsentrasjonen av AA når Michaelis konstant (K_m) for dets metaboliserende enzym CYP2E1 (Besaratinia og Pfeifer 2004). Halvering av en gitt AA-dose har vist halvering av observert DNA-addukter, som indikerer at GA blir dannet proporsjonalt ved lavere dose (Maniere, Godard et al. 2005). AA og GA fordeles likt i kroppen, og begge detoksifiseres først og fremst via konjugering med glutation (Sumner, MacNeela et al. 1992). En foreslått mekanisme av AA-toksisitet er uttømming av glutation, noe som kan bidra til å øke toksisiteten (Tyl, Marr et al. 2000).



Figur 1.2 Metabolismen av akrylamid og glycidamid hos mus. Alle sluttprodukter elimineres via urinen (Friedman 2003).

Hos rotter og mus skilles AA hovedsakelig ut i urinen og mindre mengder via avføringen (**Figur 1.2**). Noe skilles også trolig ut som CO₂ via utånding (Goffeng, Kjuus et al. 2002; Kadry, Friedman et al. 1999). Det finnes noen forskjeller i metabolismen av AA hos gnagere og mennesker (Dybing og Sanner 2003; Fennell, Sumner et al. 2005; Fennell, Sumner et al. 2006; Fuhr, Boettcher et al. 2006). Hos mus er halveringstiden ved en dose på 50 mg/kg funnet å være 0,73 timer for AA, og 1,9 timer for GA (Twaddle, McDaniel et al. 2004; Doerge, Young et al. 2005). Hos mennesker er estimert halveringstid av AA inntatt oralt via vandig løsning på 3,1-3,5 timer (Fennell, Sumner et al. 2006). GA-metabolitter utgjør mindre enn 2 % av metabolittene i urinen hos mennesker, mens hos rotter og mus utgjør dem henholdsvis 42 % og 59 % ved en intraperitoneal dose på 50 mg/kg (Sumner, MacNeela et al. 1992; Fennell, Sumner et al. 2006). Hos mennesker indikeres en lavere eliminering av AA enn hos rotter (Calleman 1996).

1.2.4 Akrylamids toksisitet

1.2.4.1 Toksisitet og bindingsaffinitet

AA er mye studert som industrikjemikalie og betegnes som nevrotoksisk, mutagent i somatiske- og kjønnsceller, og kreftfremkallende hos gnagere. I 1994 ble AA klassifisert som et "gruppe 2A karsinogen" (sannsynlig kreftrisiko) av WHO's kreftforskningsinstitutt (International Agency for Research on Cancer, IARC) (Dybing og Sanner 2003). Denne klassifiseringen er basert på at AA har gitt ulike krefttyper hos forsøksdyr. EU har klassifisert stoffet som kreftfremkallende i kategori 2 (kan forårsake kreft), mutagent i kategori 2 (kan forårsake arvelige skader) og reproduksjonstoksisk i kategori 3 (mulig fare for skade på forplantningsevnen) (European Commission Scientific Committee on Food 2002).

Det er foreslått flere mekanismer for hvordan AA er toksisk. En slik mekanisme er via "Michael-reaksjon" hvor β -karbon i molekylet reagerer med en nukleofil. Reaksjonen medfører at AA har høy affinitet til proteiner, stoffet produserer addukter med for eksempel hemoglobin og protaminer, og har svak kapasitet for binding til DNA. Markør for Michael-reaksjonen er tilførsel av ikke-kritiske thiol-grupper (-SH grupper) fra cystein til mottakeren (AA). Denne reaksjonen vil kunne være detoksifiserende, ved at kun AA som slipper unna "thiol-barrieren" vil være tilgjengelig for å reagere med DNA, eller for epoksidering til glycidamid (GA). Unntaket er ved binding til -SH-grupper i proteiner som kan føre til genetiske skader eller ha andre toksiske effekter. AA induserer genetiske effekter på

kromosomnivå, med induksjon av strukturelle kromosom-aberrasjoner, og i mindre grad numeriske kromosom-forandringer, inkludert aneuploidy. Punktmutasjoner, kromosommutasjoner, kromosomtap og rekombinasjon er effekter som er blitt observert etter AA-eksponering hos mus (oversiktsartikler av Friedman 2003; Carere 2006).

Epoksidet glycidamid (GA) har sterk bindingsaffinitet til DNA og relativ svak affinitet til proteiner (sammenlignet med AA). GA har interaksjon med DNA-baser, i størst grad ved å danne N7-guanin-addukter, og i mye mindre grad ved å danne N3-adenin-addukter (Segerbäck, Calleman et al. 1995; Costa, Churchwell et al. 2003; Doerge, Costa et al. 2005; Mei, Hu et al. 2008). Mange alkyliserende kjemikalier danner N7-Guanin-addukter (oversiktsartikkel av Koskinen og Plná 2000). Noen GA-addukter kan være promutagene, dette skyldes at de kan føre til spontan depurinering. Abasiske seter (AP-sete) som dannes under depurinering av GA-addukter kan føre til inkorporering av feil base under DNA-replikasjon og dermed føre til transversjoner (omdanninger) (Besaratinia og Pfeifer 2004). AP-seter kan være mutagene (oversiktsartikkel av Loeb og Preston 1986). For eksempel er det sett at N7-guanin-GA kan gi inkorporering av deoksyadenosin under DNA-replikasjon og dermed føre til G→T omdanning (Besaratinia og Pfeifer 2004). N3-adenin-addukter av GA kan også gjennomgå spontan depurinering, som skjer raskere enn N7-guanin-addukter; disse kan blokkere transkripsjon, som kan føre til søsterkromatinutbytninger, kromosom-aberrasjoner, "S-fase arrest" i cellesyklus, og cytotoksisitet (oversiktsartikkel av Koskinen og Plná 2000).

Det er foreslått at mekanismer som involverer kryssbinding av kromosomer eller kromosom-assosierte proteiner (protaminer) utgjør korttids risiko, mens mutagene effekter av GA utgjør langtids risiko, siden det antas at en eneste mutasjon kan føre til stor skade. Problemet er at begge disse mekanismene kan forkomme (oversiktsartikler av Dearfield, Douglas et al. 1995; Carere 2006).

1.2.4.2 Paternell toksisitet

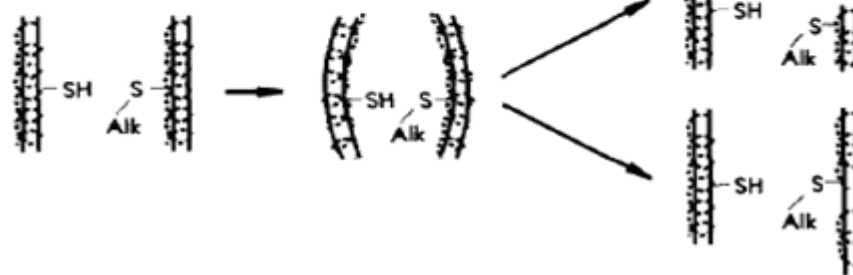
Akrylamid (AA) og dets metabolitter er kjent for å akkumulere i testis hos mus, og nå fram til foster hos gravide hunnmus (Marlowe, Clark et al. 1986). Mekanismer bak toksisitet av paternell akrylamideksponering er ikke helt forslått, og er mye omdiskutert. Det har blitt foreslått at AA radikalmediert polymerisering, som forkommer ved omdannelse til polyakrylamid kan være en mulig forklaring på skader i spermceller. Denne reaksjonen skjer

best anaerobisk (uten oksygen). Dette kan forklare forskjellen mellom skader i somatiske celler og i spermceller, siden det er lavere oksygeninnhold i testikkel (oversiktsartikkel av Dearfield, Douglas et al. 1995). Polymeriseringen av AA og betydning for spermtoksisitet er ikke godt nok studert.

(A). Normal



(B). Akrylamid behandlet



Figur 1.3 Modell for addukt-dannelse i spermkromatin ved akrylamid eksponering. Dette fører til brudd og dominant letalitet. De to heltrukne linjene representerer dobbeltrådet DNA og prikkene mellom representerer assosierte protaminer. Sulfhydryl (-SH) grupper er del av cystein i protamin og akrylamid-addukt-dannelse er vist som -Alk. I normal kjernekonkondensering (A), -SH grupper fra cystein kryssbindes til å danne disulfidbroer i kromatin. Hvis adduktdannelse av en nukleofil sulfhydrylgruppe forekommer før en disulfidbinding dannes, vil dette føre til stress i kromatinstruktur som kan føre til enkel- eller dobbel-tråddbrudd (B). Modifisert figur (Sega, Alcota et al. 1989).

En studie publisert av Sega og medarbeidere, hvor hannmus ble injisert med 125mg/kg AA, viser at frekvensen av dominante letale mutasjoner øker mot slutten av første uka etter eksponering, og faller dramatisk mot slutten av andre uka (Sega, Alcota et al. 1989). Samme studie viste at på dag 7 etter eksponering er protamin-addukter ansvarlig for mesteparten av addukt-dannelsen i spermhode (Sega, Alcota et al. 1989). De mest sensitive stadier for AA-induserte dominante letale mutasjoner er seine spermatider og tidlige spermatozoer. AA er vist å produsere arvelige translokasjoner i de samme sensitive stadiene. DNA i sein spermatogenese celler er mindre mottagelig for skade antagelig på grunn av tettpakking av kromatin i kjernen (Sega, Alcota et al. 1989) (**Kapittel 1.5.1.1**). AA kan bindes til frie sulfhydryl-grupper (-SH) i cystein i umodne protaminer som finnes i seine spermatider og i spermatozoer og dermed blokkeres normal disulfid-binding (Sega, Alcota et al. 1989). Addukter med frie sulfhydryl-grupper vil hindre normal kromatin-kondensering i

spermkjernen, og vil føre til stress i kromatinstrukturen som eventuelt kan resultere i trådbrudd og dominant letalitet (**Figur 1.3**). Addukt-dannelsen reduseres gradvis i seinere stadier av spermatogenesen ettersom det skjer en reduksjon av antall tilgjengelige frie sulfhydrylgrupper. Det er foreslått at alkylering av protein –SH-grupper også kan forekomme i spermhalen; dette kan da påvirke spermmobilitet og dermed selve befruktningen (oversiktsartikkel av Dearfield, Douglas et al. 1995). Det er observert at GA fører til skader i de samme stadiene av spermatogenesen som AA (Generoso, Sega et al. 1996).

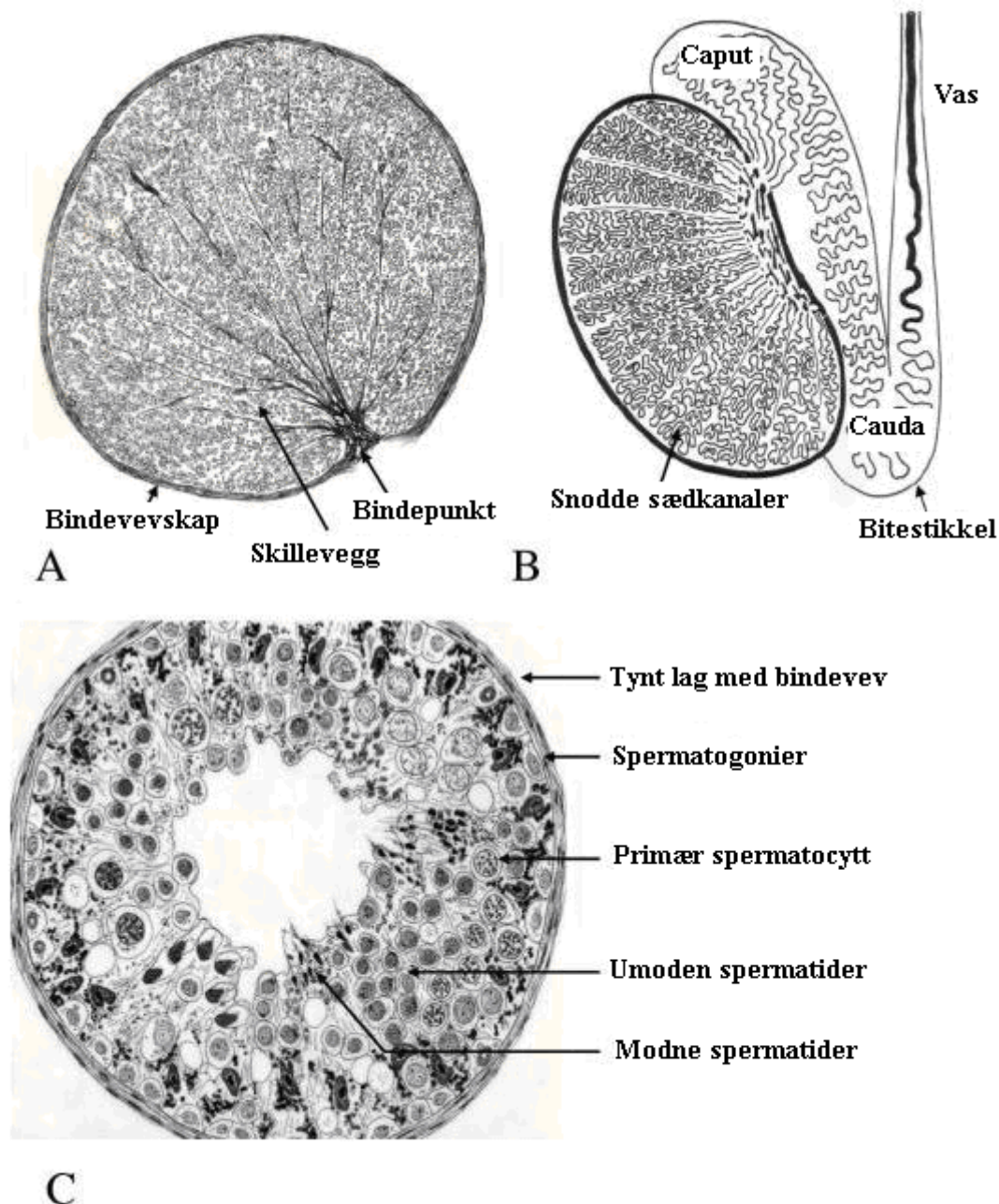
Adler og medarbeidere utførte forsøk hvor de brukte 1-aminobenzotriazole, som er et stoff som hemmer CYP2E1 og dermed oksidering av AA til GA (Adler, Baumgartner et al. 2000). Bruk av dette stoffet reduserte dominante letale mutasjoner, mens bruk av stoffet viste ingen påvirkning på spermtoksisitet. På grunnlag av disse resultatene ble det foreslått at AA også påvirker motorproteiner og derfor spermfunksjonen, mens dominant letale mutasjoner forårsakes av interaksjon mellom metabolitten GA og kromatin. Det er vist at AA hemmer to kinesin motorproteiner, KIFC5A og KRP (Sickles, Sperry et al. 2007; Friedman, Zeiger et al. 2008). Disse er ansvarlige for at kinetochor mikrotubuli bindes og løsnes fra cellematriksen. Effekter på proteinet kinesin kan ha påvirkning på cellers meiose/mitose, aksonal transport, og spermhale-aktivitet. Forstyrrelser i disse mekanismene vil kunne ha stor betydning for utvikling og funksjon av de hannlige kjønnscellene.

Det er kjent at DNA-addukter dannet i alle sperm-stadier utgjør en liten del (<0,5 %) av totale addukter (de fleste er protamin-addukter) (oversiktsartikkel av Tyl og Friedman 2003). Basert på funn av Ghanayem og kolleger antas det at GA-DNA-addukter i sperm er ansvarlige for embryotoksisitet. En studie utført av Ghanayem og kolleger viste at parring mellom AA-eksponerte wt-hannmus (50mg/kg x 5 dager) og ueksponerte hunnmus fører til redusert fertiliseringsrate, økt implantasjonstap, flere aborter, dette i motsetning til kontrollhanner og parring mellom AA-eksponerte (50mg/kg x 5 dager) CYP2E1-defekte hanner og kontrollhunner. CYP2E1-defekte mus viste ikke signifikante forskjeller verken i fertiliseringsrate, implantasjonstap eller aborter, sammenlignet med kontroller (Ghanayem et al. 2005).

1.3 Hannens reproduksjonssystem

1.3.1 Testiklene

De to testiklene ligger i hver sin del av skrotum (Bjålie, Haug et al. 2000). Hver av dem er omgitt og beskyttet av en tykk, kraftig bindevevskapsel. Fra kapselen går det ut skillevegger av bindevev. Det er lite bindevev hos mus (Russell, Ettlin et al. 1990), sammenlignet med mennesker. Bindevevet deler testikkelen i flere lapper. En testikkel består av mange tynne, snodde sædkanaler (**Figur 1.4**) og i hver sædkanal forgår det spermiereproduksjon. Produksjonen opprettholder daglig produksjon av modne spermceller (Sutovsky og Manandhar 2006). Spermproduksjonen krever en unik struktur av sædkanalene, som er isolert fra blodsystemet, og tillater kun selektiv opptak av hormonelle faktorer (oversiktsartikkel av Cooke og Saunders 2002). Mellom sædkanalene finnes blodårer og Leydig-celler som produserer mannlige kjønnshormoner (Bjålie, Haug et al. 2000). Stamceller (spermatogonier) som gir opphav til kjønnscellene utgjør det ytterste cellelaget i sædkanalene, de hviler direkte på basalmembranen. Store støttceller (Sertoli-celler) som er festet til basalmembranen, strekker seg mellom kjønnscellene/germinalcellene helt inn mot sædkanalens hulrom. Tette celleforbindelser (tight junctions) mellom støttcellene danner en barriere, blod-testis-barrieren, som atskiller vevsvæsken fra cellene og kanalvæsken inne i sædkanalene. Det finnes ikke blodårer inne i sædkanalene, og næringsstoffene må derfor diffundere fra vevsvæsken og gjennom basalmembranen. Støttcellene forsyner germinalcellene med næringsstoffer og regulerer deres modning, i tillegg produserer de hormoner. Blod-testis-barrieren og støttcellene sørger på denne måten for et eget miljø for de differensierende kjønnscellene.



Figur 1.4 Mikroskopsnitt av testikkel i forskjellige størrelser. (A) Tverrsnitt av humantestikkel. (B) Sædkanaler i humantestikkel og bitestikkel. (C) Tverrsnitt av sædkanalen til en fertil man på 32 år. Modifisert figur (Holstein, Schulze et al. 2003).

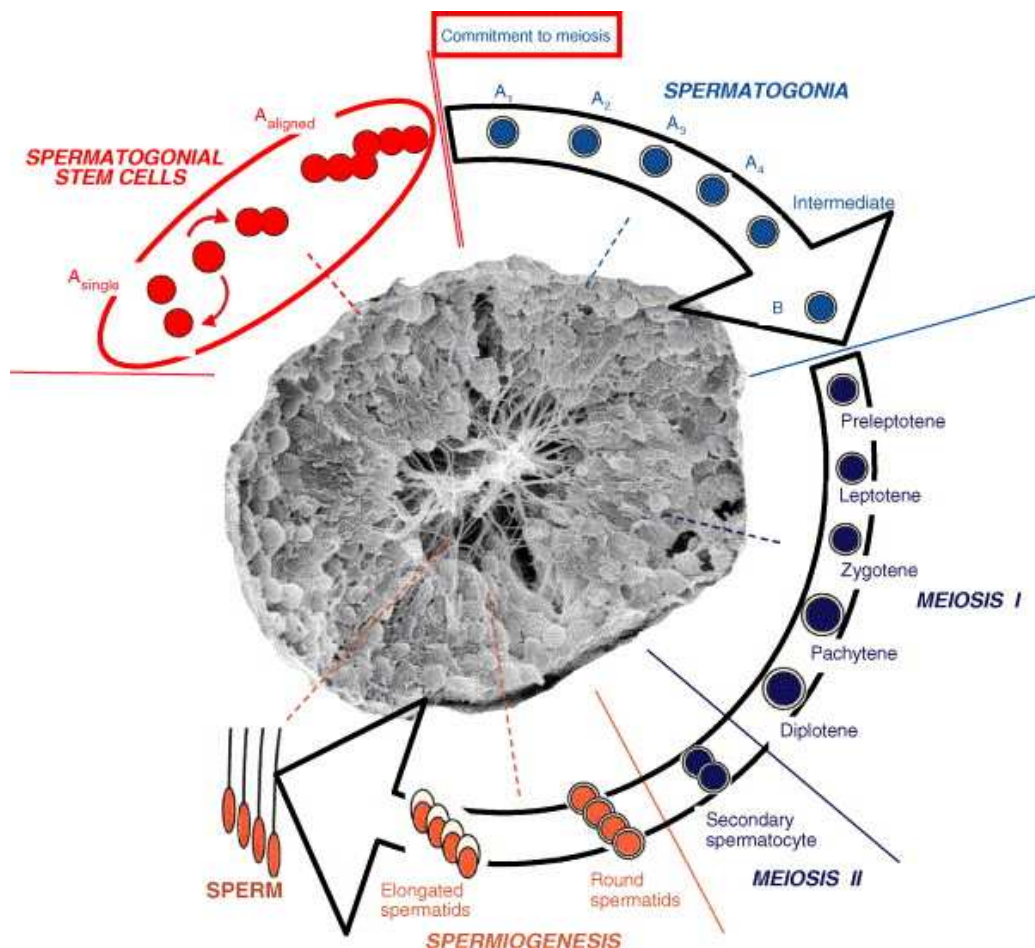
1.3.2 Spermatogenesis

Spermatogenesis betegner prosessen for dannelsen av spermier, ut fra spermatogonier. Spermatogenesis begynner i puberteten og fortsetter ut livet (oversiktsartikkel av Holstein, Schulze et al. 2003). Prosessen kan deles i fire faser; produksjon av spermatogonier (spermatogoniesen), modning av spermatocytter (meiose), differensiering av haploide spermatider (spermiogenesen) og overlevering av modne spermier fra sædkanalen (spermiering). Hele prosessen varer ~74 dager hos menneske og ~41 dager hos mus (**Figur**

1.5). Hos menneske bruker sædcellene ytterligere 10-12 dager på sin ferd gjennom bitestikken til sædblæra, så hele prosessen fra spermatogonier til moden sperm tar ca. 86 dager (~3 måneder).

1.3.2.1 Spermatogoniesen

Det finnes flere typer av spermatogonier, avhengig av posisjon i den sædproduserende kanalen, morfologi og kjernestruktur. Hos mennesket deles spermatogoniene inn i A lys-, A mørk-, og B- spermatogonier (oversiktsartikkel av Holstein, Schulze et al. 2003). A-spermatogonier kan ikke passere blod-testis-barrieren. Disse deler seg og gir opphav til nye stamceller, eller differensieres til type B-spermatogonier, som videre gir opphav til spermatocytter (Sutovsky og Manandhar 2006).



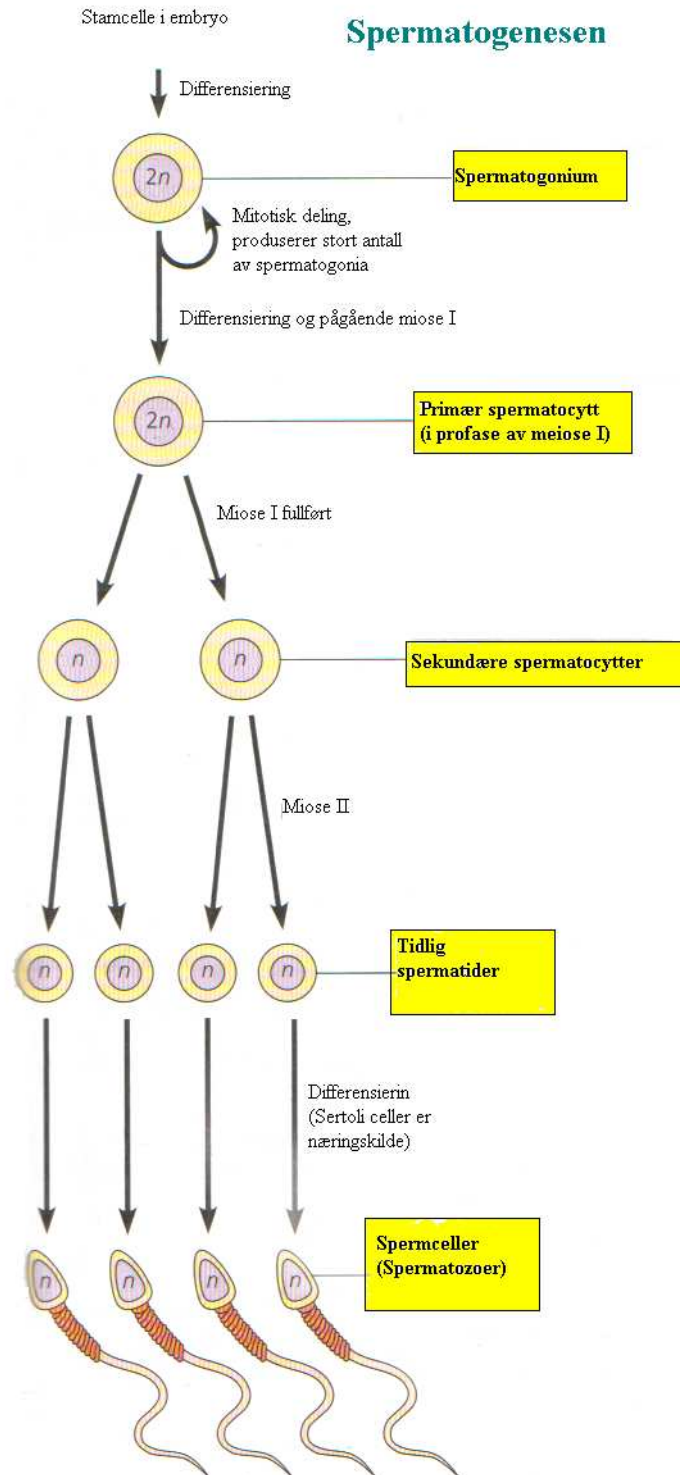
Figur 1.5 Spermatogenesisen hos mus. Spermatogenesisen i sædledere bruker ~ 41 dager. De prikkede linjene indikerer hvor i sædkanalen differensieringsstegene skjer. Celledelinger i stamcellene (i rødt) er asynkronisert, og tar 5,3 dager. Spermatogoniene modnes i løpet av 7,4 dager. Meiose I tar 13,7 dager, mens meiose II og videre modning bruker 14,1 dager. Modifisert figur (Olive og Cuzin 2005).

1.3.2.2 Meiosen og spermiogenesen

Mitotisk deling av type B-spermatogonier starter allerede i basaldelen av sædkanalen (**Figur 1.6**) (oversiktsartikkel av Holstein, Schulze et al. 2003). Disse cellene passerer blod-testis-barrieren over til adluminaldelen, og her gjennomgår spermatocytene to reduksjonsdelinger (miose I og miOSE II), resultatet blir fire haploide celler (fra hver spermatocyt), kalt spermatider (**Figur 1.6**). I spermiogenesen foregår differensiering av spermatider. I løpet av differensieringen blir kjernechromatin kondensert til 1/10 av volumet til umoden spermatid. Det dannes enzymfylt akrosomhette via golgi og binding til kjernen, videre utvikles halestruktur og dets implantasjon til kjernen.

1.3.2.3 Spermiering og tap av spermceller

Modne spermatider frigjøres fra Sertoli-celler til lumen, og blir til spermatozoer (oversiktsartikkel av Holstein, Schulze et al. 2003). Fra lumen transporteres spermatozoer til bitestikkel (epididymis) der modningen fullføres (Meistrich, Hughes et al. 1975). De forskjellige delene av bitestikkelen betegnes ofte caput epididymis (hode), corpus epididymis (kroppen), og cauda epididymis (halen) (oversiktsartikkel av Cosentino og Cockett 1986) (**Figur 1.7**). Disse delene har forskjellige funksjoner (Meistrich, Hughes et al. 1975), caput fremmer mobilitet, corpus øker fertiliseringsevne, mens cauda bidrar til videre modning. Det er først i cauda at spermatozoer modnes nok til kunne fertilisere en oocyt. Her fullføres den kompakte pakkingen av DNA. Det er kjent at det finnes artsforskjeller i hvor lang tid spermatozoer bruker på å passere bitestikkelen (Turner 1995). Hos mus bruker de opptil ~9 dager i bitestikkelen (Meistrich, Hughes et al. 1975). Bitestikkelkanalen munner ut i sædlederne, og herfra kan modne spermceller transporteres til sædblæren og gjennom urinrøret ved ejakulasjon (Bjålie, Haug et al. 2000). På veien blandes spermene med næringsrik sekret fra prostata, og de andre mindre kjønnskjertlene. Slik dannes sæd, som består av spermier og sekreter fra kjønnskjertler.

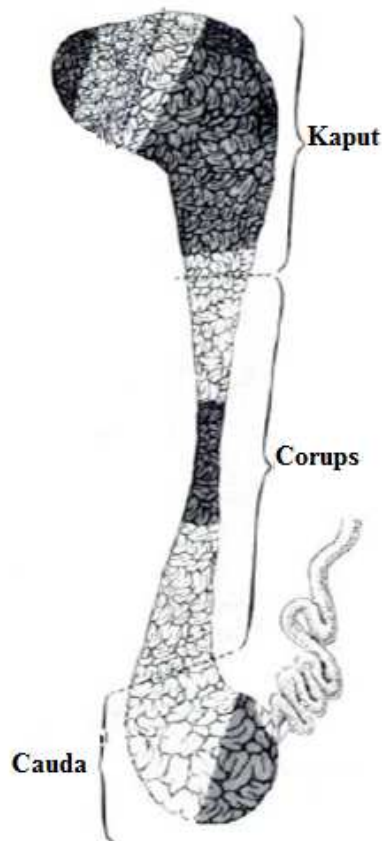


Figur 1.6 Meiotiske stadier i spermutviklingen. Meiose delingene reduserer kromosom antall fra diploid ($2n$) til haploid (n). Modifisert figur (Campbell og Reece 2002).

Omlag 75 % av kjønnscellene dannet under spermatogenesisen går tapt via apoptose (programmert celledød) eller degenerasjon (oversiktsartikkel, Holstein, Schulze et al. 2003). Kun 25 % av cellene når ejakulatet, og av dem er mer enn halvparten misdannet, dermed vil

om lag bare 12 % av spermcellene være tilgjengelige for reproduksjon. Sammenlignet med laboratoriedyr er spermproduksjonen hos mennesker mindre enn halvparten (per gram vev).

Bitestikkel



Figuren 1.7 Rottebitestikkel. Figuren viser inndeling av testikkel i tre deler. Figuren er modifisert fra (Trasler, Hermo et al. 1988).

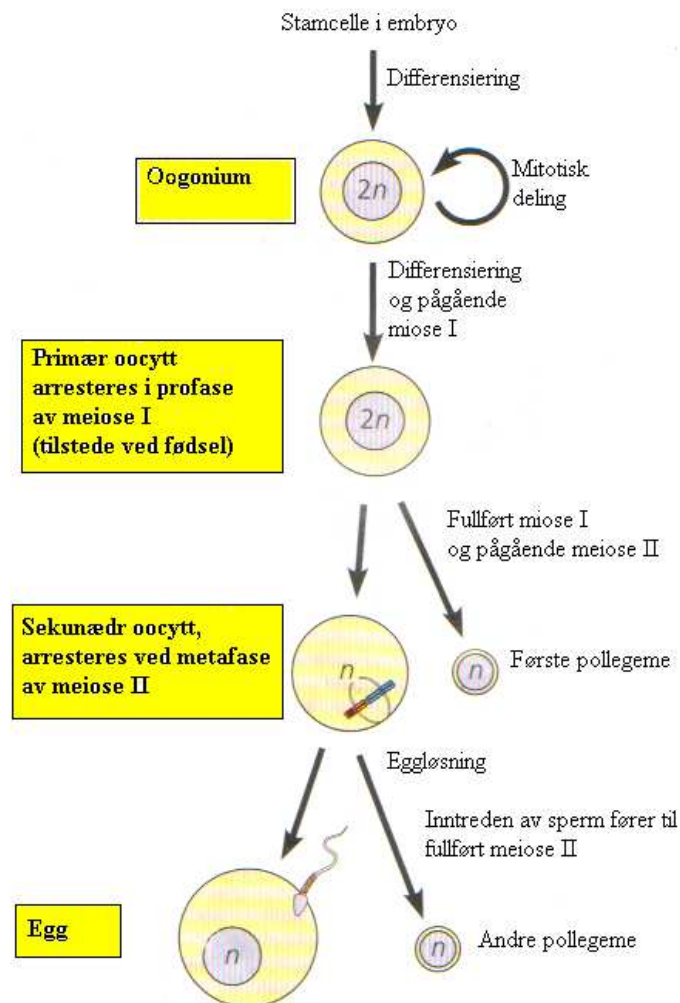
1.4 Hunnens reproduksjonssystem

1.4.1 Oogenese

Ulikt spermatogenesisen som har konstant produksjon av nye kjønnsceller, har man i oogenesisen modning av et begrenset antall egg. Hos hunnmus dannes grunnlaget for oocytterne allerede fem dager etter befruktning (Schultz 1986). Dette resulterer i at hunnmus blir født med et antall egg i eggstokkene. Også hos mennesker har jentebarn ved fødsel alle sine primære oocytter dannet i sine eggstokker (Campbell og Reece 2002). Hver primær oocytt er arrestert ved profase av meiose I (**Figur 1.8**). Hos mennesker fullfører en enkel primær oocytt (per måned) meiose I og utvikles til sekundær oocytt, dette starter i løpet av puberteten. Meiotisk deling i oogenesisen involverer unik cytokinese, der den ene dattercellen blir til pollegeme med

svært lite cytoplasma. En sekundær oocytt fullfører meiose II bare ved inntreden av en spermcelle. I reproduktiv alder begynner museoocytter å vokse fra en diameter på ca 12 μm til 85 μm i løpet av to uker (Schultz 1986). Under denne veksten dannes zona pellucida som omslutter plasmamembranen. Hos mus modnes det 12-14 oocytter per syklus (Schultz 1986), mens hos kvinner modnes 1-2 oocytter per syklus (Campbell og Reece 2002).

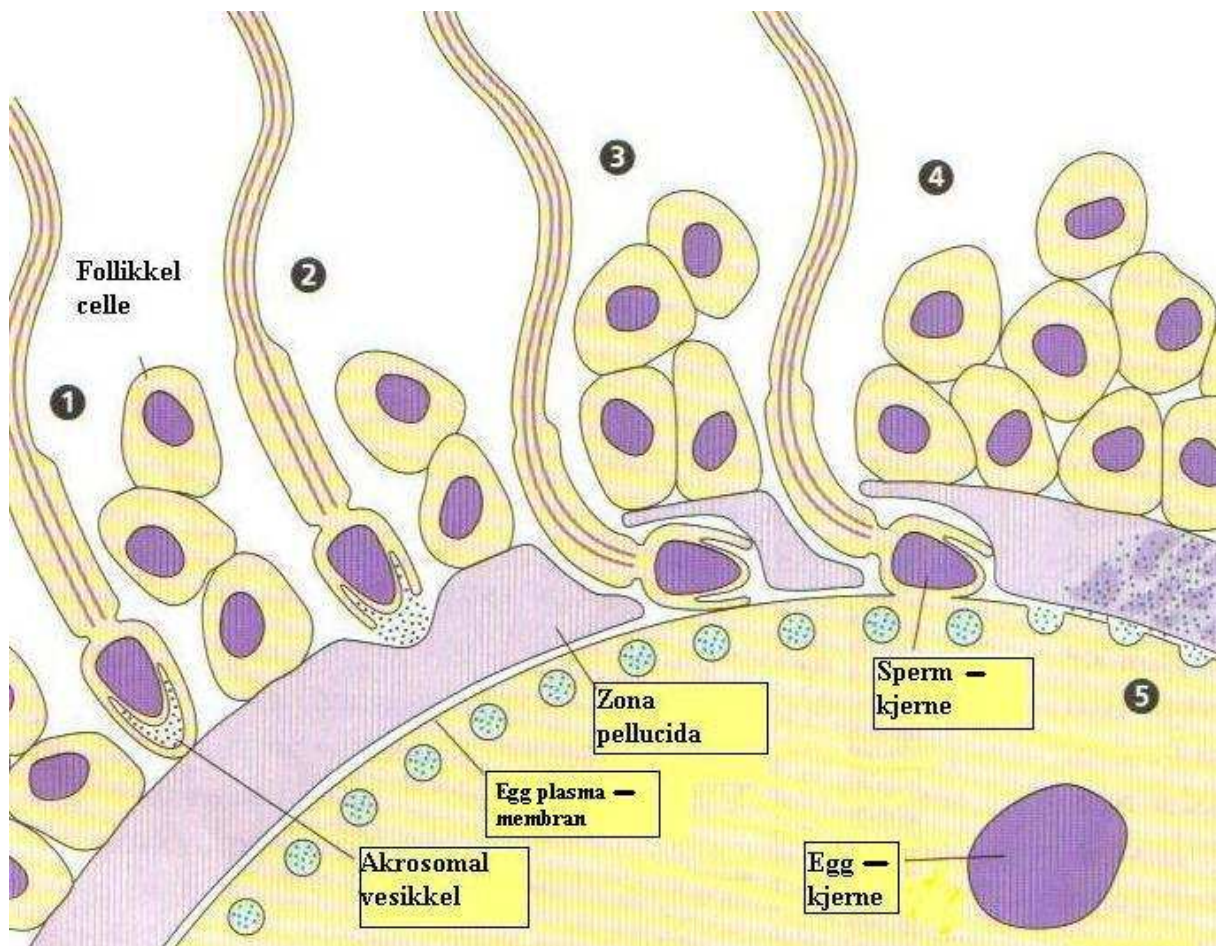
Oogenesen



Figur 1.8 Meiotiske delinger av oogonium til oocytt. Figuren viser eggproduksjon med differensiering av germinale kjønnsceller i embryo til oogonia, som videre utvikles til primær oocytt. Les teksten for nærmere beskrivelse. Figuren er modifisert (Campbell og Reece 2002).

1.5 Fertilisering

Spermkjerne beskyttes av ytre kjernematriks, som danner en stiv overflate bestående av strukturelle proteiner stabilisert av disulfidbroer, i blanding med forskjellige andre proteinmolekyler; noen av disse deltar i celledisignalisering når de frigjøres i eggcytoplasma under fertilisering (Sutovsky og Manandhar 2006). Spermhalen gir bevegelseskraft til spermcellen. Halemidtdelen er dekket av mitokondriellag, disse danner energigrunnlag for spermhalens bevegelse. Senere blir mitokondriene eliminert gjennom målrettet proteolyse, i det befruktede egget (oversiktsartikkel av Fawcett 1975). Etter fertilisering (**Figur 1.9**) dekonteres spermDNAet (Naish, Perreault et al. 1987). Denne prosessen er karakterisert ved reduksjon av disulfid-bindingene i protaminer etterfulgt av degradering av disse kjerneproteinene ved at de erstattes med histoner.

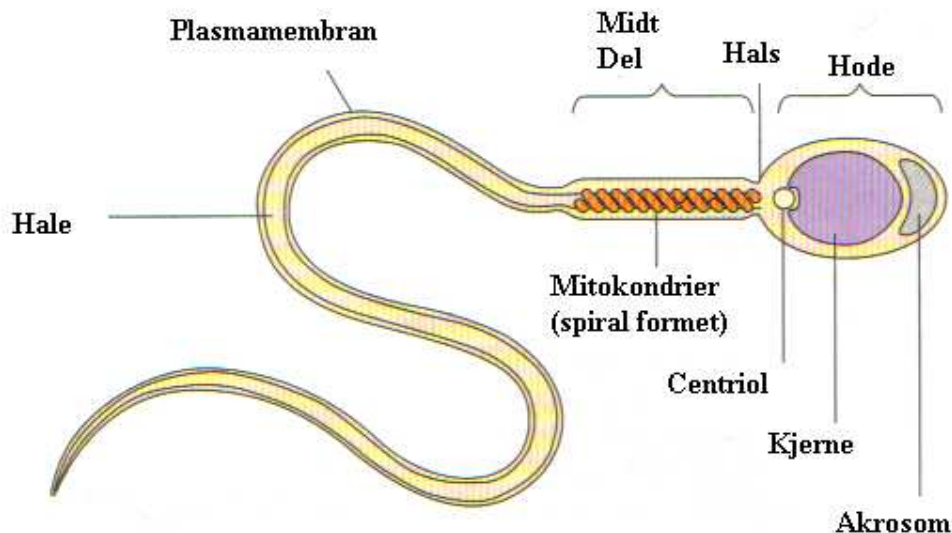


Figur 1.9 Fertilisering hos pattedyr. 1. Spermcelle migrerer gjennom kappen av follikkelceller og binder seg til reseptormolekyler i zona pellucida av egget. (Reseptormolekylene er ikke vist her). 2. Denne bindingen induserer akrosomal reaksjon, hvor sperm frigjør hydrolytiske enzymer inn i zona pellucida. 3. Ved hjelp av disse enzymer når sperm plasmamembranen til egget, og membranproteiner i spermcellen bindes til reseptorer på eggmembranen. 4. Plasmamembranene sammensmelter, og gjør det mulig for innholdet av spermcellen å inntre i egget. 5. Enzymer frigjort i løpet av eggets kortikalreaksjon hardner zona pellucida, som nå vil fungere som en blokk for polyspermi (Campbell og Reece 2002).

Første celledeling etter befruktning tar ~24 timer, dette gir nok tid til reorganisering av kromatin, ny transkripsjon og tidlig transisjon av genetisk kontroll fra maternelt genom til zygotens genom (Schultz 1986); embryogenomet er ikke aktiv før etter første celledeling (Flach, Johnson et al. 1982). Egget kontrollerer utviklingen av zygoten inntil embryogenomet uttrykkes (Braude, Bolton et al. 1988). På slutten av to-cellestadie er mye maternelt mRNA degradert, og alle klasser av RNA transkriberes av embryogenomet hos mus (Schultz 1986). Slik sett avhenger den initielle kapasiteten til DNA-reparasjon av genuttrykking til egget.

1.5.1 Spermcellen

En spermcelle bidrar til halvparten av et embryogenom (**Figur 1.10**). DNA i spermceller er tettere pakket enn somatiske celler.



Figur 1.10 Struktur av humant spermcelle. Modifisert figur (Campbell og Reece 2002).

1.5.1.1 DNA-pakking i spermceller

DNA er en lineær, ugreinet polymer, som består av to lange nukleotidkjeder organisert i en dobbelttrådet heliks med hydrogenbindinger mellom komplementære baser (Brown 2002). Hvert enkelt nukleotid består av tre komponenter: 2'-deoksyribose (en pentose), en nitrogenbase (cytosin, tymin (begge enkeltring pyrimidiner), adenin eller guanin (dobbeltring puriner)), og en fosfatgruppe med en, to eller tre fosfatenheter. Flere nukleotidenheter bundet sammen via fosfodiesterbindinger mellom 5'- og 3'-karboner utgjør en polynukleotid.

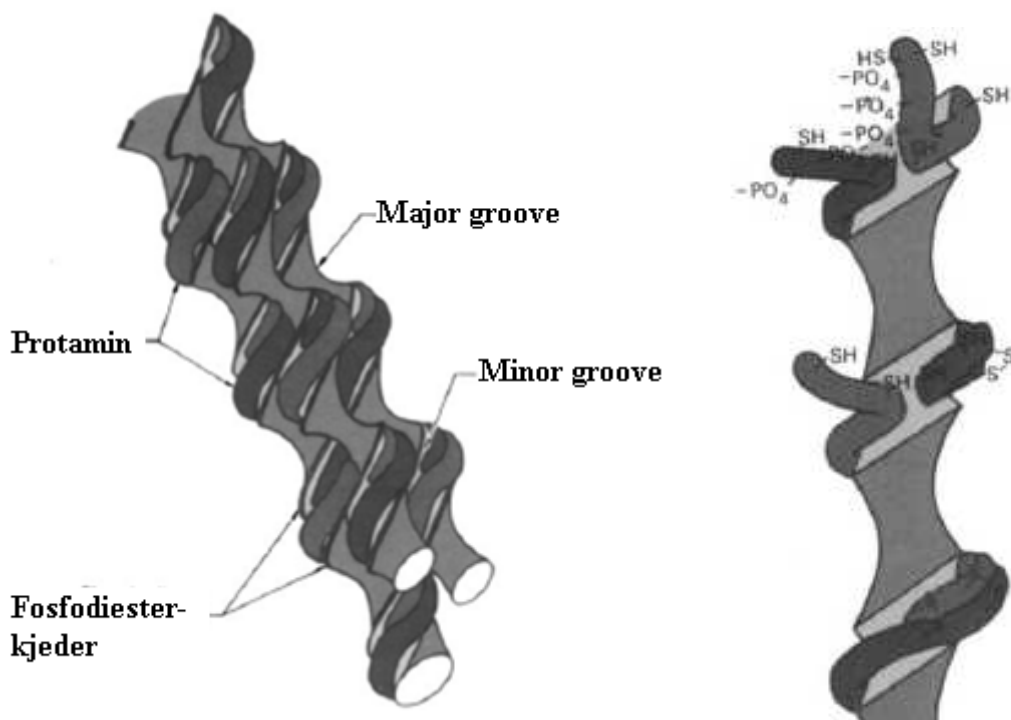
Et DNA-molekyl kan ha en mye større lengde enn det kromosomet som det er pakket i, derfor er det nødvendig med et høyt organisert pakkingssystem (Brown 2002). I somatiske celler er kjerneDNA assosiert med DNA-bindingsproteiner kalt histoner. DNA-tråd tvunnet to ganger rundt histoner ser ut som bønner på tråd. Bønnene betegner nukleosomer, og hver nukleosom består av åtte histon-proteiner, som er to av hver histotypene H2A, H2B, H3 og H4. I tillegg finnes det også andre proteiner kalt koblingshistoner, disse er bundet til DNA mellom nukleosomer for å danne kromatosom. Videre pakking og spiralisering gir til slutt en veldig kompakt struktur, kalt 30-nm solenoidfilamenter på grunn av diameter på 30 nm.

Spermkjernen er nesten helt fylt av DNA, mens en somatisk cellekjerne bare er delvis fylt (Ward og Coffey 1991). En studie utført av Pogany og kolleger (1981) viser at spermDNA ikke kan være pakket rundt nukleosomer på grunn av mindre kjerneplass i spermhode (Pogany, Corzett et al. 1981). Dette henger sammen med at under spermatogenesen erstattes fleste histoner ved hjelp av transisjonsproteiner med protaminer; det anslås at spermkromatin består av ~15 % histoner og ~85 % hos mennesker (Pogany, Corzett et al. 1981; Balhorn 1982; Ward og Coffey 1991; Sutovsky og Manandhar 2006). Protaminene er positivladde DNA-proteiner som er halvparten så store som histoner, de har høyt innhold av arginin og cystein (Sega, Alcota et al. 1989). Kromatinet i musesperm har høyere innhold av protaminer enn humant spermkromatin (ca. 90 %) (Pogany, Corzett et al. 1981). Det finnes to typer av protaminer i spermkromatin hos mus, den ene inneholder dobbelt så mye cystein enn den andre, men begge bidrar til økt tettpakking. Dette skyldes cysteingrupper som bidrar med å danne disulfidbindinger (Balhorn 1982). Disulfidbindingene er en viktig del av tettpakkingen, siden spermkromatin stabiliseres av protaminmolekyler med disulfidbindinger imellom seg, og til DNA.

Store deler av DNA i somatiske celler er negativt kveilet, dette skyldes superkveiling induisert av histoner som er i samme retning som vil strekke ut (unwind) dobbeltheliksen ved baseparbrudd. Balhorn (1982) framsatte en modell for kromatinstruktur i spermceller (**Figur 1.11**). I følge modellen mangler spermDNA superkveiling til dobbeltheliks. Mangel på superkveiling i spermDNA henger sammen med protamin-pakkingen. Modellen (Balhorn 1982) viser at protaminer er bundet til DNA ved å ligge horisontalt inni "minor groove" av DNA. Beregninger har vist at det er nok positivladde arginingrupper på protaminer i musespermkjernen til å nøytralisere negativt ladde fosfatgrupper på DNA, dermed vil protamin-DNA-komplekset i en DNA-tråd passe inn i "major groove" av nærliggende DNA-

tråd. DNA i spermkjernen er dermed pakket i en laminærstruktur, dette resulterer i at spermDNA er mer enn seks ganger tettere pakket enn DNA i somatiske celler (oversiktsartikkel av Ward og Coffey 1991).

I somatisk celler er solenoidfilamentene på 30-nm organisert ved at de er bundet til en kjernematrisk for ca hvert 60 000 basepar, på denne måten danner de sløyfer av DNA. Kjernematriks organiserer DNA tredimensjonalt i kjernen, og denne organiseringen varierer blant celletyper (oversiktsartikkel av Ward og Coffey 1991). Laminærpakking av spermkromatin er også organisert i sløyfer via en kjernematriks, forskjellen er at DNA i spermkjernen inneholder halvparten så mange sløyfer som DNA i somatiske celler, dette bidrar også til tettpakking av spermDNA.



Figur 1.11 Modell for kromatinpakking i sperm. Til høyre vises kryssbinding av protaminmolekyler i DNA-protamin kompleks. Etter defosforylering av serin og threonin kryssbindes hvert protaminmolekyl til det neste via multiple disulfidbroer, dermed låser protaminene seg rundt DNA. Til venstre vises pakking av DNA-molekyl i kromatin. Ved fullstendig nøytralisering av fosfodiesterkjeder elimineres normale elektrostatiske krefter mellom nærliggende DNA-segenter, og molekylet vil bli mer tettere pakket. For å minimalisere plassen som kreves for pakkingen, har protamindelen som stikker ut fra "minor groove"(inkludert C- og N-enden) interaksjon med polyargininsegment, som er plassert i "major groove" av nærliggende DNA-molekyl. De to gjenværende arginindelene i N-enden og enkel arginin i C-enden kan danne hydrogenbindinger med seter inni "major groove". Modifiserte figur (Balhorn 1982).

1.5.2 DNA-skaderesponser i embryo

Sperm med DNA-skade beholder fertiliseringsevnen (Ahmadi og Ng 1999a; Ahmadi og Ng 1999b), dette kan føre til at DNA-skaden blir en del av neste generasjon, et annet utfall kan bli spontan abort av embryoet. DNA-skaderesponser etter paternell kjemisk eksponering kan omfatte blant annet reparasjon av DNA, eller skaden kan fjernes ved at cellen undergår apoptose (programmert celle død) (oversiktsartikkel av Hales, Aguilar-Mahecha et al. 2005).

Som berørt tidligere, er zygoten transkripsjonelt inaktiv rett etter fertilisering og er i stor grad avhengig av mRNA og protein fra oocytten for utvikling gjennom første celledeling (oversiktsartikkel av Jaroudi og SenGupta 2007). Det antas at ikke-reparert skade i oocyt eller sperm repareres før første celledeling. Hos pattedyr uttrykkes DNA-reparasjonsgener i et embryo tidlig under utviklingen. Robaire og medarbeidere har vist induksjon av reparasjonsgener i rotteembryoer etter cyklofosamid-eksponering av far (Harrouk, Robaire et al. 2000). Det er flere gener som sjekker i å sjekke at alt er som det skal være i et utviklende embryo. Dette er viktig siden et skadet embryogenom vil forstyrre tidlig utvikling, hvilke omfatter forstyrrelse av blant annet nødvendige endringer i kromatinstruktur, prokjernedannelse, og zygotisk genomaktivering (oversiktsartikkel av Hales, Aguilar-Mahecha et al. 2005).

Koordinering av cellesyklus er et nøkkelaspekt i respons overfor DNA-skader (oversiktsartikkel av Jaroudi og SenGupta 2007). Cellesyklusarrest ved sjekkpunkter i G1/S eller G2/M tillater at DNA-reparasjon kan gjennomføres før DNA-replikasjon eller celledeling (Aquilina, Crescenzi et al. 1999). Her vil flere DNA-reparasjonsmekanismer ha betydning, sammen med gentoksiske stress-sensorer kan de innvirke på deler av cellesyklus. Videre kan noen DNA-skade-sensorer utløse et sjekkpunkt som aktiverer apoptose (Vinson og Hales 2002). Induksjon av apoptose skjer hvis skaden er omfattende og reparasjon ikke kan gjennomføres (oversiktsartikkel av Raff 1992; Wyllie 1995). Betydning til cellesyklus-sjekkpunkter i forbindelse med gentoksisitet er godt studert i kreftmodeller, men lite er kjent om deres regulering eller aktivering under utviklingen (Vinson og Hales 2002).

Omtrent alle typer celler har forsvarssystemer som passer på at cellenes genetiske materiale holdes intakt og at det genetiske materiale som replikeres ikke inneholder feil (Roos og Kaina 2006). Dersom det allikevel etableres feil i genmaterialet, finnes det mekanismer som kan hindre videre "spredning" av feilene (Brancolini, Lazarevic et al. 1997; Roos og Kaina 2006).

Ved hjelp av teknikken "Fluorescence in situ hybridisation" (FISH) analyse av delingsstadier i embryoer fra mennesker, har man observert at cellesyklus-sjekkpunkter muligens ikke fungerer tidlig i embryoutviklingen (Delhanty og Handyside 1995; Harrison, Kuo et al. 2000). Senere er dette bekreftet ved at tidlige embryostadier mangler stressresponser, som sjekkpunkter i G1/S og G2/M, og apoptose (Adiga, Toyoshima et al. 2007).

Det finnes tre strategier for en celle for å ta hånd om et skadet genom. Den kan fjerne de skadde lesjonene fra genomet, eller den kan fortsette å fungere selv med skader som kan ha innvirkning på cellulær metabolisme og kan forårsake celledød eller kreft i organet som den er en del av. Siste valget er å aktivere apoptose som vil føre til celledød. Et valg mellom disse tre mulighetene kan bestemme skjebnen til hele organismen (Vinson og Hales 2002). Apoptose i løpet av de første celledelinger vil svekke overlevelsessjansene hos et embryo. Apoptose i pattedyrembryoer er observert ved seine delinger eller i blastocyststadier (oversiktsartikkel av Hardy 1999; Brison 2000). Regulering av apoptose i disse stadiene er viktig, ettersom det eliminerer skadde celler; dermed beskyttes integriteten til celler som gir opphav både til fosteret og til kjønnsceller, som skal bringe den genetiske arven videre (Brison 2000). Det er vist økt apoptose i organogenesen som følge av gentoksisk stress-eksponering (Mirkes 2002).

1.5.2.1 Histon-proteinet H2AX

Dette proteinet blir omtalt særskilt, fordi det brukes i en av teknikkene for å studere DNA-skaderespons. H2A er et histon-protein, det finnes fire typer av dette proteinet, inkludert H2AX (oversiktsartikkel av Ismail og Hendzel 2007). Histonet H2AX har en spesiell C-terminal som inneholder Serin (på posisjon 139). Serin 139 blir raskt fosforylert i celler og dyr når DNA-dobbeltråddbrudd induseres av forskjellige fysiske og kjemiske påkjenninger (Rogakou, Pilch et al. 1998; Rogakou, Boon et al. 1999). Fosforylering av H2AX (γ H2AX) assosieres med rask reparasjon av dobbeltråddbrudd og brukes derfor ofte som en markør for dobbeltråddbrudd.

Det antas at skade i sperm-kromatin kan omdannes til dobbeltråddbrudd etter fertilisering (Adiga, Toyoshima et al. 2007; Marchetti, Essers et al. 2007), og dobbeltråddbrudd-reparasjon er svært viktig i en-celle-zygote. Ureparerte dobbeltråddbrudd kan medføre store skader, dette fordi de kan føre til tap av store deler av DNA i løpet av mitosen (oversiktsartikkel av Lieber, Ma et al. 2004). Feil reparasjon av dobbeltråddbrudd kan resultere i kromosomfeil. Cellulær

respons til dobbeltråddbrudd er karakterisert av akkumulering av reparasjonsproteiner i såkalte reparasjonsfoci, disse kan studeres ved hjelp av fluorescensmikroskopi (Rogakou, Pilch et al. 1998; Rogakou, Boon et al. 1999; Petrini og Stracker 2003). Celler som mangler H2AX reparerer dobbeltråddbrudd sakte (Celeste, Petersen et al. 2002). Høy frekvens av kromosomtranslokasjoner er observert hos museceller som mangler H2AX, hvilket indikerer at fosforylert H2AX bidrar til å opprettholde genomisk stabilitet (Celeste, Petersen et al. 2002; Franco, Gostissa et al. 2006). Det er vist at initiering av DNA-fragmentering under apoptose induserer fosforylering av H2AX (Rogakou, Nieves-Neiras et al. 2000).

1.5.2.2 Tumorsupressorproteinet p53

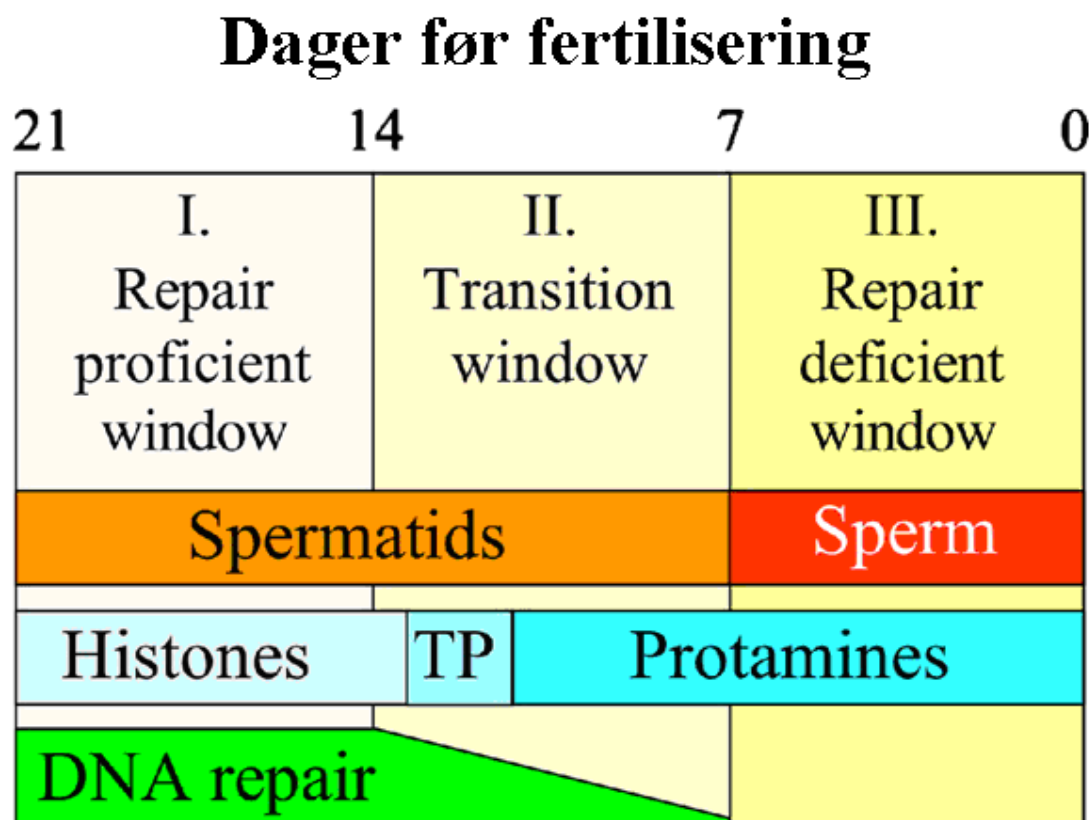
I cellen spiller p53 en sentral rolle i DNA-skaderespons (Fridman og Lowe 2003; oversiktsartikkel av Vousden og Lane 2007). p53 har både transkripsjonelle og ikke-transkripsjonelle effekter. Transkripsjonelle effekter ansees som sentrale for p53s evne til å regulere cellesyklus, overlevelse og DNA-reparasjon. p53 er et sentralt og velstudert, men dets rolle i tidlig embryoutvikling er mindre kjent. Normal fungerende p53 protein har evne til å aktivere transkripsjon, føre til cellesyklusarrest og indusere apoptose (Fridman og Lowe 2003). Som nevnt tidligere er apoptose en fundamental prosess i utviklingen av celler og balansen mellom dem, i alle multicellulære organismer (Roos og Kaina 2006). Ved mutasjon i p53-genet vil cellen dele seg, selv om den har feil, på grunn av defekter i kontrollsystemet (oversiktsartikkel av Vousden og Lane 2007), og dette kan være en initial faktor i karsinogenesen. Genet er vist å uttrykke også i museembryoer (Schmid, Lorenz et al. 1991). Det er vist at museembryo med ikke-fungerende p53 overlever minst til fødselen, men det oppstår mange forstyrrelser assosiert med et ikke-fungerende p53 (Armstrong, Kaufman et al. 1995).

1.6 DNA-reparasjon

Det finnes flere typer mekanismer for reparasjon av DNA (Brown 2002). *Direkte reparasjon*, som navnet tilsier, virker direkte på skadet nukleotid, og omdanner hvert av dem tilbake til dets originale struktur. *Eksisjons-reparasjon* involverer utklipping av et skadet polynukleotidsegment, etterfulgt av resyntese av riktig nukleotidsekvens via en DNA-polymerase. *Feilparringsreparasjon* retter feil i replikasjon ved å klippe ut en del av enkeltrådet DNA med feil nukleotid etterfulgt av nysyntese av det utkuttete området. *Rekombinasjonsreparasjon* er involvert i blant annet reparasjon av dobbeltråddbrudd.

Oocytter har effektive DNA-reparasjonsystemer av disse typene. Dette inkluderer blant annet fjerning av base som er feil inkorporert, reparasjon av AP-seter (abasiske-seter), reparasjon av enkelttrådbrudd og dobbelttrådbrudd (det siste ved ikke-homolog ende-sammensveising eller rekombinasjon), og reparasjon av oksidative skader (Nouspikel og Hanawalt 2002).

Det er lite kunnskap om reparasjon av DNA i spermceller. Det er kjent at DNA-reparasjon forekommer i mitose og i postmitotiske spermstadier hos hannmus (Sega 1979). Det er observert reduksjon i kapasiteten til flere mekanismer for DNA-reparasjon i løpet av spermatogenesisen (Jansen, Olsen et al. 2001; Marchetti og Wyrobeka 2008) (**Figur 1.12**), samtidig er det vist at mutasjonsfrekvensen reduseres i løpet av spermatogenesisen hos unge mus (Walter, Intano et al. 1998). Loon og medarbeidere observerte at trådbrudd og andre alkalilabile-lesjoner forårsaket av gammastråling ble reparert i spermatocytter og runde spermatider, men ikke i elongerte spermatider (Loon, Boer et al. 1991; Loon, Sonneveld et al. 1993).



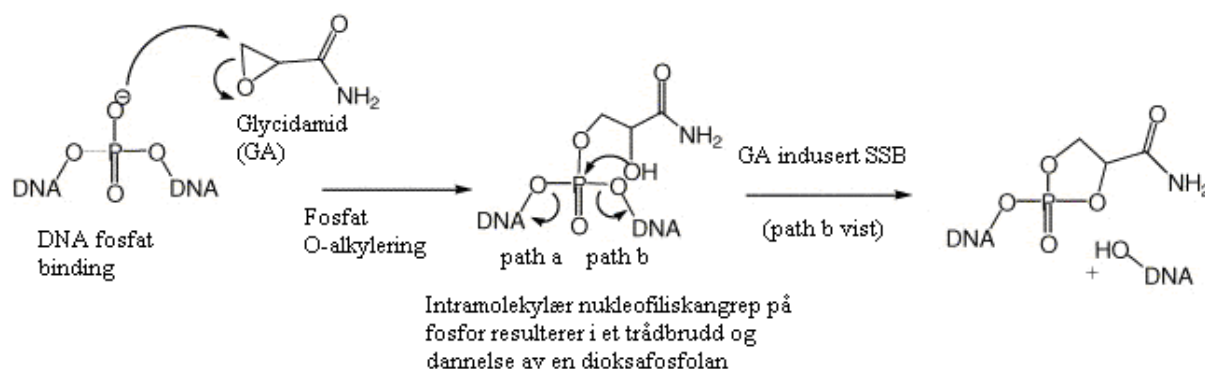
Figur 1.12 Modell for nedgang i DNA-reparasjon i spermceller. Figuren viser den generelle nedgangen i DNA-reparasjon ettersom kromatinkondenseringen øker i løpet av spermatogenesisen (Marchetti og Wyrobeka 2008)

Det er vist at mange BER (baseeksisjonsreparasjon) er svært effektiv i testikkelceller (oversiktsartikkel av Olsen, Lindeman et al. 2005). Imidlertid synes kapasiteten til å fjerne 8-oksoguanin-addukter å være lav i humane testikkelceller. Det er observert begrenset NER (nukleotidekksisjonsreparasjon) i testikkelceller (Jansen, Olsen et al. 2001). Det antas at DNA-addukter fra glycidamid (GA) blir reparert ved hjelp av BER (Johansson, Lundell et al. 2005).

1.6.1 Baseeksisjonsreparasjon (BER)

Skadde eller modifiserte baser kan skyldes eksponering for eksogene forbindelser som sigarettøyk, industrielle kjemikalier, kreftterapi og via stråling. De hyppigste DNA-skadene i testikler repareres av baseeksisjonsreparasjon (BER), og i mindre grad av nukleotidekksisjonsreparasjon (NER) (Brunborg, Duale et al. 2007). BER forårsaker små strukturelle forandringer i DNA (Olsen, Bjørtuft et al. 2001), og kan deles i kort-lapp reparasjon (Short-patch repair, SPR), og lang-lapp reparasjon (long-patch repair, LPR), avhengig av hvor mange baser som utklippes, henholdsvis en i SPR, og opptil ti i LPR (oversiktsartikkel av Olsen, Lindeman et al. 2005).

Et forsøk gjort med pattedyrceller (Johansson, Lundell et al. 2005) tyder på at baseskader induisert av GA repareres av SPR-BER. Samme studie forslår en mekanisme for reprasjon av GA-induserte enkelttråddbrudd. Mekanismen går ut på at det først skjer en dannelsen av en GA-fosfat-addukt som kan reagere via en intramolekylær S_N2 reaksjon som resulterer i enkelttråddbrudd og danner et dioksafosfolan-produkt med lukket ring (**Figur 1.13**).



Figur 1.13 Modell for hvordan glycidamid (GA) kan indusere tråddbrudd. Figuren viser foreslått mekanisme av GA-indusert enkelttråddbrudd (Singel strand break, SSB). Modifisert figur fra (Johansson, Lundell et al. 2005).

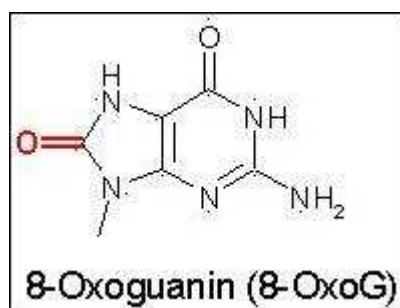
1.6.2 Fpg (Formamidopyrimidin DNA-glykosylase)

Formamidopyrimidin DNA-glykosylase (Fpg) tilhører en stor gruppe av DNA-glykosylaser. Et sentralt trinn i baseeksisjonsreparasjon (BER) starter ved at en av DNA-glykosylase gjenkjenner og fjerner skadde eller modifiserte baser som gir strukturelle endringer i DNA. DNA-glykosylasene kutter bindingen mellom base og sukkerenheten (glykosidbindingen). Det dannes da et baseløst apurin/apyrimidin-sete (AP-sete), som for øvrig også kan dannes spontant ved hydrolyse. Hver DNA-glykosylase gjenkjenner et spesifikt sett av DNA-substrater og spesifisiteten til reparasjonsveien er derfor bestemt av hvilken DNA-glykosylase som er involvert. Det finnes to klasser DNA-glykosylaser; monofunksjonelle og bifunksjonelle. De monofunksjonelle fjerner kun den modifiserte basen, mens bifunksjonelle (som f. eks Fpg) også kutter i fosfodiestertråden 3' for det baseløse sukkeret (gir et enkelttråddrudd) via sin AP-lyaseaktivitet (oversiktsartikler av Mol, Parikh et al. 1999; Zharkov, Shoham et al. 2003).

Fpg-enzymet har affinitet til AP-seter pluss ring-åpnede puriner, og Fpg lager tråddrudd ved slike DNA-modifikasjoner. Det er grunn til å tro at et viktig addukt i denne sammenhengen er N7-guanin-GA (Baum, Loeppky et al. 2008). En annen og sentral type skade som Fpg gjenkjenner er oksidativ DNA-skade som for eksempel 8-oksoguanin (Collins, Dobson et al. 1997). Ved fjerning av 8-oksoguanin (**Figur 1.14**) fra DNA fører Fpg til DNA-tråddrudd som kan påvises i en revidert kometmetode. Fpg kan benyttes i en modifisert utgave av kometmetoden. For enkelte gentoksiske stoffer oppnår man da mulighet for påvisning av spesifikke typer skader på DNA, og i tillegg øker man deteksjonssensitiviteten for slike DNA-skader. Det er vist økning av deteksjonssensitiviteten ved bruk av Fpg på GA-induserte DNA-skader i flere celletyper, inkludert i humane lymfocytter (Blasiak, Gloc et al. 2004; Thielen, Baum et al. 2006; Baum, Loeppky et al. 2008). Det er kjent at akrylamid (AA) kan gi opphav til oksidative skader (Puppel, Tjaden et al. 2005). Siden humane testikkelceller har begrenset kapasitet til å reparere viktige oksidative DNA-lesjoner (Olsen, Duale et al. 2003), kan dette innebære en virkningsmåte for hvordan AA og GA kan forstyrre reproduksjon og indusere *de novo* (nye) mutasjoner som kan overføres til avkommet.

Det antas at spermDNA er utsatt for oksidative skader (oversiktsartikkel av Lewis og Agbaje 2008; Lopes, Jurisicova et al. 1998). Grunnen kan være høy innhold av flerumettede fettsyrer i spermceller (oversiktsartikkel av Sanocka og Kurpisz 2004). Flerumettede fettsyrer virker som substrat for reaktive oksygenforbindelser. Oksidativ stress tenkes å oppstå via endogene

og eksogene faktorer (Collins, Cadet et al. 1997). Frie radikaler som hydroksylradikalet ($\bullet\text{OH}$) dannes som biprodukt under respirasjon, ved reaksjon med reaktive forbindelser, som for eksempel superoksid ($\text{O}_2\bullet^-$). De fleste radikaler av denne typen blir håndtert av forsvarsmekanismer representert av cellulære antioksidanter, som inkluderer superoksid dismutase, katalase, glutation og assosierte enzymer. Radikalene kan også håndteres av antioksidanter tilført via mat (blant annet vitamin C, E og flavonoider), som forhindrer at de kan skade biomolekyler som proteiner, lipider eller DNA. I tillegg til den uunngåelige endogene produksjonen av reaktive oksygenforbindelser, har man eksogene kilder som for eksempel røyking, luftforurensning, tungmetaller og andre miljøgifter.



Figur 1.14 Strukturen til 8-Oksoguanin (http://www.az-biologie.de/genetik_allgemein.htm)

1.6.3 Metoder for å måle DNA-skade i spermceller

De mest vanlige metodene brukt for å måle skader i spermDNA er kometmetoden, Tunel (terminal dUTP nick-end labeling), og SCSA (Sperm Chromatin Structure) (oversiktsartikkel av Evenson og Wixon 2005). Kometmetoden måler fragmentering av DNA i celler. Antall publikasjoner basert på bruk av kometmetoden har økt betraktelig siden kometmetoden først ble publisert. I de fleste publikasjonene i seinere år brukes alkaliske betingelser ofte med variasjoner i forskjellige steg (Klaude, Eriksson et al. 1996; Olive og Banáth 2006). Den alkaliske kometmetoden oppdager enkelttråddrudd, alkalilabile seter, baseløse seter, DNA-DNA / DNA-protein kryssbindinger, og enkelttråddrudd som følge av DNA-reparasjon (Tice, Agurell et al. 2000; Yusuf, Vian et al. 2000). Utførelsen av kometmetoden avhenger celletype som brukes, og i teorien er det mulig å bruke alle eukaryote celletyper.

Tunel (terminal dUTP nick-end labeling) og SCSA (Sperm Chromatin Structure) er flowcytometri-baserte metoder. Tunel identifiserer enkelt- og dobbeltråddrudd ved å merke frie 3'OH med modifiserte nukleotider i en enzymatisk reaksjon, ved hjelp av terminal deoksynukleotidyl transferase (TdT). TdT virker i polymeriseringen ved å polymerisere frie

3`OH-DNA-tråder på en templat-avhengig måte, og inkorporere merkede nukleotider (Ramos og Wetzels 2001). Skadenivået i celler måles deretter ved hjelp av fluorescensintensitet. Som med kometmetoden er også Tunel-metoden kjent for at det er variasjoner i protokollen som benyttes i forskjellige laboratorier. SCSA (Sperm Chromatin Structure) måler DNA-denaturering ved lav pH, som påvirkes av forekomsten av DNA-skader (eventuelt pakkingsfeil) (oversiktsartikkel av Evenson og Wixon 2005). Mekanismen for SCSA er ikke helt klarlagt. I SCSA brukes ”DNA-fragmenteringsindeks” (DFI) for å uttrykke skaden. DFI er kjent for å være større for infertile men enn fertile. Dette er en metode som er mye brukt i kliniske sammenheng.

1.7 Målsettinger for oppgaven

Eksposering av hannmus for akrylamid er vist å kunne redusere fertilitet og spermkvalitet samt gi en økning i pre- og postimplantasjonstap. Det er imidlertid usikkerhet rundt hvilke akrylamidinduserte skader som gir opphav til reproduksjonstoksitet, og dermed også om slike effekter kan forventes ved lavere eksponeringsnivåer.

Konkrete mål:

1. Optimalisere kometmetoden for å måle DNA-skade i musesperm.

For å studere mekanismer relatert til paternelt medierte skader på embryoutvikling trenger man et mål på skadenivå i spermceller. Å måle DNA-skader i sperm er utfordrende fordi spermDNA er svært kompakt og sensitiv for håndteringsskader. I denne oppgaven ble det jobbet spesielt med å optimalisere kometanalyse av sperm.

2. Hvilke stadier i spermatogenesis gir opphav til størst DNA-skade i sperm etter akrylamid-eksponering?

Akrylamid gir opphav til ulik type kromatinskade avhengig av stadiet i spermatogenesis. Vi ønsket å undersøke nivået av DNA-skader i spermceller målt med kometmetoden i ulike tidspunkt etter en enkelteksponering for akrylamid. Videre ville vi teste hvorvidt SCSA er en egnet metode for å måle de AA-induserte skadene.

3. Dannes det oksidative DNA-lesjoner i sperm fra eksponert mus?

Akrylamideksponering er vist å gi både glycidamid-DNA-addukter og oksidative DNA-skader. Ved å benytte Fpg (Formamidopyrimidin DNA-glykosylase) i kometmetoden vil man kunne detektere oksidative DNA-lesjoner. Vi har undersøkt tilstedeværelsen av Fpg-sensitive DNA-lesjoner i spermceller etter eksponering for akrylamid og metabolitten glycidamid.

4. Har akrylamid-eksponert sperm effekter på tidlig embryoutvikling?

Studier har vist at akrylamideksponering av far fører til skader hos utviklende embryoer. Det skulle undersøkes om en mer moderat enkelteksponering for akrylamid *in vivo* påvirker fertilitetsrate og tidlig embryoutvikling. Etablering av *in vitro* fertilisering ved MIKT var en del av dette delmålet.

5. Blir sentrale DNA-skaderesponsproteiner induisert i embryoer fertilisert med akrylamid-eksponert sperm?

DNA-skaderespons i celler i det tidlige embryoet synes å være annerledes enn i somatiske celler. Vi målte uttrykk av proteiner assosiert med DNA-skaderespons: proteinene p53 og γ H2AX ble undersøkt ved hjelp av immunfluorescens.

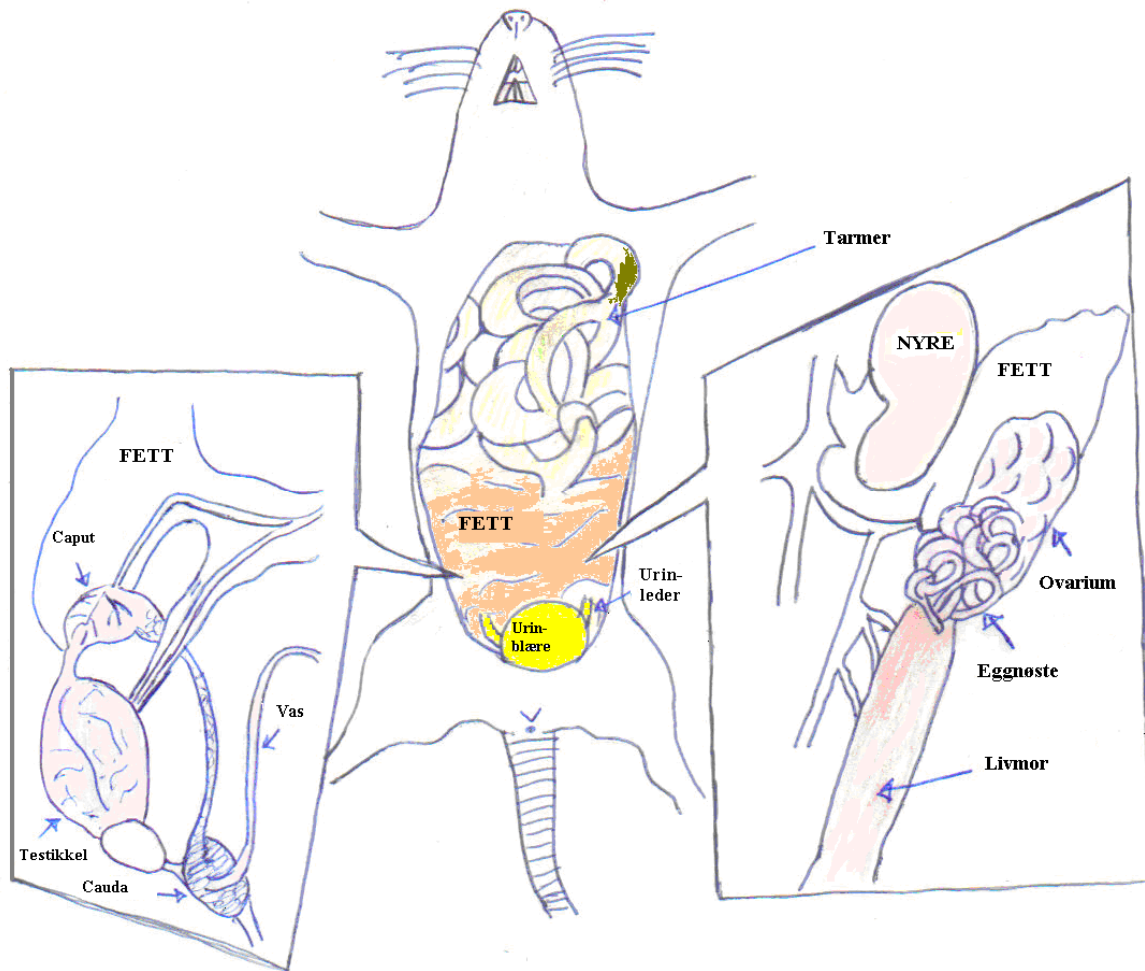
2. MATERIALER OG METODER

2.1 Mus

Mus ble holdt i plastbur på Folkehelseinstituttet med 14 timer lys og 10 timer mørke syklus (avlsforhold for hunnmus og hannmus før overføring til eksponeringsbur), eller 12 timer lys og 12 timer mørke (hannmus før og etter eksponering), kontrollert luftfuktighet på (55±5 %) og temperatur (20-24 °C). Vann og fôr (Harlan Teklad 2018, et kombinasjonsfôr, til både avl og vedlikehold) ble gitt *ad libitum*. Avliving av mus ble utført med CO₂- gass, og alle retningslinjer for forsøksdyr ble fulgt.

Til kometmetoden ble det brukt hannmus fra en tilbakekrysset muselinje. Den originale muselinjen var heterozygot for DNA-reparasjonsproteinet Ogg1, og var generert i en blandet bakgrunn (129SV og C57BL/6J). Muselinjen ble tilbakekrysset med homozygote BigBlue®C57/BL/6 mus, Stratagene (La Jolla, California, USA) i ni generasjoner for å kunne benyttes i mutasjonsanalyser. I våre forsøk brukte vi mus som var villtype for Ogg1 for i senere forsøk kunne sammenligne med Ogg1-defekte dyr.

Til *in vitro* fertilisering ble det brukt to musestammer. I starten benyttet vi BigBlue/Ogg1 wt-mus, men på grunn av problemer med oocyttkvalitet og fertiliseringsrate gikk vi over til å bruke hybridmus som tilhørte kommersiell linje B6D2F1. Hunnmusene ble bestilt 3-4 uker gamle fra Charles River Laboratories, Inc., de ble avlivet ca 2 uker senere. Hannmus ble brukt når de var mellom 8 til 12 uker gamle. Både AA-eksponering av hannmus, og hormonbehandling av hunnmus ble utført intraperitonealt. Hannmus ble veid rett før de ble sprøytet og igjen før avlivning. Etter avlivning ble mus dissekert for isolering av caudasperm og eggledere (**Figur 2.1**).



Figur 2.1 Dissekert mus. Mus ble avlivet og dissekert. Tarmene og fettet ble dratt opp slik at organene under dem ble synlige. Eggnøsten hos hunnmus ble klipt ut. Cauda og Vas ble klipt ut hos hannmus.

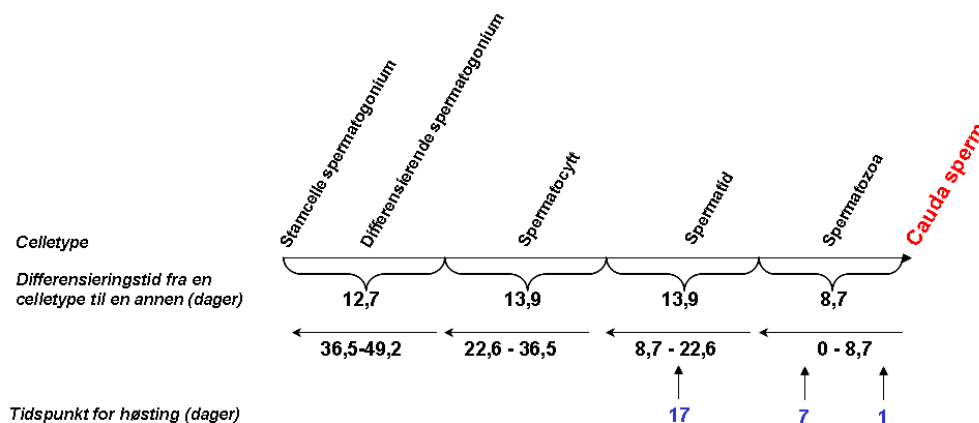
2.2 Eksponering og isolering av spermceller

Til kometanalyse ble hannmus injisert intraperitonealt (injeksjon i bukhulen) med 50 mg/kg kroppsvekt AA løst i PBS (laget samme dag, 3 mg/ml). Kontroller ble injisert med likt volum PBS per kroppsvekt. Ved eksponering var hannmus 8-13 uker gamle. Vi avlivet musene 24 timer, 7 dager, og 15-17 dager etter eksponering (**Figur 2.2**). Bitestiklene ble isolert i dyrestallen (**Figur 2.1**). Den ene ble direkte frosset ned på tørris, mens den andre ble tatt med til labben i et eppendorfrør med M2-medium. I labben brukte vi stereomikroskop med kaldlampe belysning til å rense bitestiklene. Det ble laget 3-4 snitt i tubuli med en disseksjonssaks, og spermcellene ble forsiktig skviset ut. Cellene ble så overført til et eppendorfrør med M2-medium og sentrifugert. Supernatanten ble kastet og 6 µl av pellet (spermceller) ble løst i 994 µl PBS. Dette henger sammen med punkt **c**) i beskrivelse av kometmetoden (**kapittel 2.3.1**).

For *in vitro* forsøk med kometmetoden ble det brukt spermceller fra kontrollmus. Til SCSA og IVF forsøkene benyttet vi spermceller isolert 7 dager etter *in vivo* eksponering for 50 mg/kg kroppsvekt akrylamid (AA). Nedenfor er *in vitro* eksponeringsutførelse beskrevet.

Framgangsmåte (*in vitro* eksponering til kometmetoden):

1. Vask av isolert caudasperm i 1 ml PBS ved å sentrifugere, 700 g (rcf) i 8 minutter.
2. Etter sentrifugering ble supernatanten pipettert ut, og kastet. 6 µl pellet (spermceller) ble løst i 994 µl 5mM GA. Pellet med kontrollceller ble løst i 994 µl PBS.
3. Celledøsningsene ble blandet godt.
4. Løsningene ble inkubert 1 time i vannbad ved 32 °C. Etter *in vitro* eksponering ble cellene igjen vasket med PBS. *In vitro* eksponeringssteget ble utført mellom punkt **b)** og **c)** under kometmetoden, fremgangsmåte (**kapittel 2.3.1**).



Figur 2.2 Eksponeringsregime i forhold til stadiet i spermatogenesisen. Mus ble eksponert for AA og sperm isolert etter 24 timer, 7 dager og 15-17 dager. Figuren er basert på tall fra (Meistrich, Reid et al. 1975)

2.3 Kometmetoden

Kometmetoden måler DNA-skade i enkeltceller. Rydberg og Johansen (1978) var de første til å kvantifisere DNA-skade i individuelle celler (Rydberg og Johansen 1978). Senere utviklet Singh og kolleger (Singh, McCoy et al. 1988; Tice, Agurell et al. 2000) en modifisert metode som ble kalt mikrogelelektroforeseteknikk. Celler ble støpt inn i agarosegel på objektglass, lysert, og deretter elektroforet ved pH 10. Elektroforese ved pH 10 oppdaget DNA-

dobbeltråddbrudd, men ikke enkelttråddbrudd. De fleste gentoksiske stoffer inducerer 5 til 2000 ganger flere enkelttråddbrudd enn dobbeltråddbrudd. Singh og kolleger modifiserte derfor metoden nok en gang fra "nøytral" (pH 10) til alkalisk (pH~13) (Singh, Danner et al. 1989). Den alkaliske versjonen av metoden ble kalt enkeltcelle-mikrogelelektroforese, senere kometmetoden. Navnet skyldes skadet DNA som migrerer mot anoden under elektroforesekjøring og gjør at DNAet utenfor kjernen kan likne en komet (Hughes, Lewis et al. 1997).

Det er ikke helt klart hva slags form DNA i komethalen er i. En mulig forklaring er at komethalen består av frie og ødelagte ender av DNA (Collins, Dobson et al. 1997), en annen er at den består av DNA-fragmenter. Uavhengig av dette fungerer haleintensiteten som et mål for DNA-skade (Olive og Banáth 2006). Ved skade antas det at DNA-strukturen er løsere, og løse ender er i stand til å migrere under elektroforesen. I kontrollceller forventes det mer runde kometer siden uskadet DNA ikke har løse DNA-ender.

2.3.1 Kometmetoden brukt på spermceller

På grunn av tettpakkingen av DNA i sperm trengs det egne betingelser under lysering av disse cellene (oversiktsartikkel av Lewis og Agbaje 2008). For måling av DNA-skader i spermprøver fra mus og mennesker er den alkaliske versjonen av kometmetoden den mest sensitive og reproducerbare (Hughes, Lewis et al. 1997). Alkalisk komet med modifikasjoner ble derfor brukt i denne masteroppgaven. Under blanding av spermløsninger og støping i agarose ble det brukt avklipte spisser, for å begrense eventuelle mekaniske skader på spermcellene. Det er kjent at uforsiktig pipettering og risting kan forårsake forstyrrelser i sperm-membranen, og gi unødvendig bakgrunnsskade (Szczygiel og Ward 2002).

I denne masteroppgaven ble forskjellige betingelser utprøvd (agarosekonsentrasjon, lyseringsløsninger, og elektroforesetid). Prosedyren beskrevet under er den som ble benyttet for hovedparten av forsøkene.

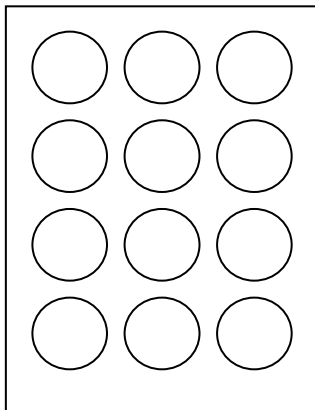
Framgangsmåte (Kometmetoden):

Dag 1:

a) Elektroforesebuffer (stamløsning) ble fortynnet 10 ganger, og oppbevart over natt, 4 °C.

Dag 2:

- b) Agarløsning stamløsning (lavt smeltepunkt), oppbevart ved 4 °C ble smeltet i mikrobølgeovn, og holdt varm på varmeblokk (37 °C).
- c) Celleprøver (*in vivo* eksponert og/eller *in vitro* eksponert) ble sentrifugert i eppendorfrør (700 g (rcf), 8 minutter), supernatant fjernet, og ~6 µL celler ble løst i 994 µL PBS.
- d) Cellene ble vasket to ganger i 1ml PBS, 700 g (rcf) for 8 minutter i sentrifugeringsmaskin. Ved hver vask ble det fjernet 900 µL av supernatanten, og ny PBS tilsatt slik at sluttvolumet ble 1 ml.
- e) Lyseringsløsningene ble laget.
- f) 1 ml celleløsning (løst i PBS) ble videre fortynnet, avhengig av hvor mange brønn som skulle støpes. En brønn støpes med 60 µL løsning (agarose pluss celleløsning)
- g) Celleløsningen og 1,7 % agarose ble blandet med forhold på 1:10. GelBondfilmer med plastrammer (**Figur 2.3**) ble støpt på kald underlag. Det ble laget et lite kutt nederst på høyreside av filmen, for å holde orden på hvilke vei elektroforese ble kjørt.



Figur 2.3 En GelBondfilm. En rad av brønner (tre brønner) per behandling ble støpt. Slik kunne det bli støpt opptil fire ulike behandlingsprøver per film.

- h) Etter støping lå filmene til tørk i ~ 2 minutter.
- i) Cellene ble lysert ved å plassere GelBondfilmene (fire) i et kar med 300ml lyseringsvæske. Først 30 minutter i lyseringsløsning A (med DTT, 4 °C), så 90 minutter i lyseringsløsning B (med LIS, 20 °C).
- j) Utstrekking (unwinding) av DNA-molekylene ble utført i 20 minutter (1 x 5 minutter, så 1 x 15 minutter) med elektroforesebuffer (pH 13.2) ved 4 °C.
- k) Elektroforese ble utført ved at fire filmer ble plassert i et kar. Karet ble fylt opp med kald elektroforesebuffer (pH 13.2) til filmene var fullstendig dekket, og elektroforese ble satt i gang; 20V og 300mA strøm i 20 minutter ved 4 °C.

- l) Etter elektroforesen ble GelBondfilmene nøytralisert ved å vaske filmene 3 ganger i 5 min med nøytraliseringsbuffer.
- m) Fiksering av filmer ble utført ved at filmene ble skylt en gang i destillert vann før de ble plassert i et kar med 300 ml etanol (>1,5 time) ofte over natt.
- n) Etter fiksering med etanol ble filmene lagt til tørk (>3 timer).

Dag 3:

- o) Filmer ble farget med SYBR[®]Gold i 20 minutter på bevegende underlag. SYBR[®]Gold er et fluorokrom (maksimum eksitasjon/emisjon i synlig lys: 495/537). Dette binder seg til både enkel og dobbeltrådet- DNA, samt RNA (Yusuf, Vian et al. 2000), og gjør det mulig å visualisere DNA ved fluorescensmikroskopi.
- p) Etter farging ble filmer skylt i destillert vann for å vaske bort overflødig SYBR[®]Gold, før noen dråper vann og dekkglass ble lagt på gelene. Filmene kunne bli oppbevart mørkt, 4 °C i 2-5 døgn for avlesning, deretter tørket og arkivert.
- q) Videre ble filmer analysert og skåret for kometer.

For å øke sensitiviteten av kometmetoden benyttet vi oss av enzymekstraktet Formamidopyrimidin DNA-glykosylase (Fpg), dette er beskrevet i neste kapittel.

2.3.1.1 Bruk av Formamidopyrimidin DNA-glykosylase (Fpg) i kometmetoden

Det ble brukt Formamidopyrimidin DNA-glykosylase (Fpg) på noen av cellebehandlingene til spermkomet. Formålet var å undersøke om det dannes oksidative DNA-lesjoner i sperm isolert 24 timer etter *in vivo* eksponering med 50 mg/kg kroppsvekt akrylamid (AA), og i sperm *in vitro* eksponert 1 time med 5mM glycidamid (GA). Fpg øker sensitiviteten til metoden (Collins, Dobson et al. 1997), ved å binde seg til DNA og føre til tråddrudd ved spesifikke lesjoner (oversiktsartikkel av Zharkov, Shoham et al. 2003), som vil vises i form av økt haleintensitet ved kometavlesning.

Enzymeksponeringssteget ble utført etter lysering og før utstekking (unwinding), mellom punkt i) og j) (**kapittel 2.3.1**). Siden det tok lang tid med enzymeksponering, kunne GelBondfilmene ligge i mild lysering (uten DTT) over natt. Neste dag ble cellene lysert først med løsning A (med DTT) så med løsning B (med LIS) før enzymbehandling. I denne oppgaven foregikk Fpg-behandling i en enzymbuffer (Collins, Dobson et al. 1997), som ble tilsatt serum albumin (Bovine Serum Albumin, BSA). BSA bindes til uspesifikke seter som

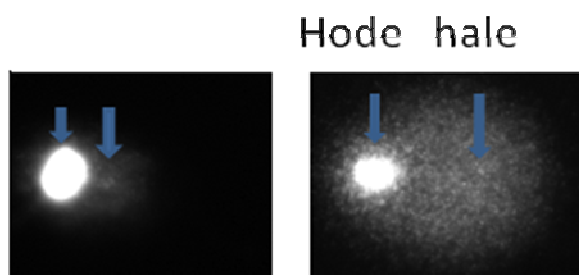
for eksempel til fett syrer (Spector, John et al. 1969), og hindrer uspesifikk binding og virkning av Fpg.

Framgangsmåte:

1. Vask av GelBondfilmer i destillert vann for fjerning av lyseringsløsning og saltrester.
2. Vask i enzymbuffer; 10 minutter ved 4°C, for å vaske bort rester av lyseringsløsninger og vann.
3. Vask i nytt bad med enzymbuffer i 50 minutter ved 4 °C, og klargjøring av falconrør (1 stk pr. film), med 40 ml enzymbuffer pluss BSA (0,2 mg/ml). Rørene ble så forvarmet i varmeskap (37 °C, >20 min), frem til enzymbehandling.
4. Ca. 5 minutter før enzymbehandling (sluttkonsentrasjon 1 µg/µl) ble enzymet (Fpg-ekstrakt) tint og tilsatt de forvarmede bufferne (med unntak av kontroll), og overført til små kar med respektive filmer, og inkubert i 1 time ved 37 °C.
5. Forsatte på punkt **k**) under kometmetoden (fremgangsmåte) (**kapittel 2.3.1**).

2.3.2 Skåring av kometer

For skåring av kometer ble programmet "Comet Assay IV" fra Perceptive Instruments Ltd. tatt i bruk. Mikroskopet var Olympus BX51 (Japan) med en A312f kamera (Basler Vision Technologies, Tyskland), og Olympus brenner med kvikksølv lampe (Mercury Short-Arc HBO® 100 W/2 lamp) fra Osram, Tyskland. Kometer ble skåret manuelt av avleser med 40 x størrelse. Programmet måler blant annet følgende parametre: kometenes hodelengde, halelengde, haleintensitet (%), halebredde og totalintensitet. Dataene brukes så til kvantifisering av det relative nivået av DNA-skade i enkeltceller og cellepopulasjoner. **Figur 2.4** viser hvordan sperm-kometer ser ut.



Figur 2.4 Sperm-kometer. Til venstre vises komet fra kontrollsperm, mens til høyre vises komet fra sperm isolert 7 dager etter in vivo eksponering med 50 mg/kg akrylamid. Pilene peker på kometens hode og hale. Det er større hale i eksponert celle, sammenlignet med kontroll. Haleintensitet brukes som et mål på DNA-skade.

Videre ønsket vi å forsterke noen av resultatene fra kometmetoden. Derfor benyttet vi en tilleggs metode, SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), denne metoden er beskrevet i neste kapittel.

2.4 SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)

Metoden er beskrevet av Evenson og Jost 2000. Dette er en standardisert metode som benyttes både for forskning og for kliniske formål. Metoden er flowcytometri-basert. DNA-denaturering utføres med 30 sekunders syredetergent behandling, så farges DNA med akridinorange (AO) som binder både enkelttrådig og dobbelttrådig DNA, men med ulik fluorescens (Evenson og Jost 2000). Det er spesielt viktig med nøyaktig denatureringstid og korrekt pH for at denne metoden skal gi optimale, og sammenlignbare resultater. En referanseprøve (caudasperm fra ueksponert dyr) og en positiv kontroll (caudasperm isolert 11 dager etter eksponering for MMS 150mg/kg kroppsvekt) ble fortynnet i TNE-buffer og nedfrosset (- 80°C) i allikoter. Programmet BDFACSDiva versjon 5.0.2 ble brukt til å avlese 10.000 celler per prøve, og lage soner som markerte hovedpopulasjonen av spermceller i referanseprøve og spermceller med mindre tettpakket DNA (skadde celler). Til forsøkene ble det brukt frosset cauda til å skvise ut spermceller til SCSA. Disse cauda-prøvene ble nedfryst fra mus som ble brukt i spermkomet. Nedfryste prøver ble tatt ut fra fryseren (- 80 °C) og medbrakt til labben på tørris. Ved håndtering av spermceller ble det brukt genomiske tipper (stor bredde i tuppen).

Framgangsmåte:

1. Frossen cauda ble tint, og spermen ble forsiktig klemmt ut i kald dråpe (300 µl) TNE-buffer i en petriskål på en kald plate. Fra petriskålen ble spermløsningen overført til eppendorfrør gjennom et filter for fjerning av celleklumper og debris.
2. Flow-maskinen (BD LSRII) ble kalibrert ved å kjøre gjennom en standard løsning med merkede kuler, dette var for å sjekke laserinnstillingene. For SCSA ble den blå laseren brukt til eksitering (488-laseren, 10-30 mW), og signaler i følgende bølgelengde ble avlest: 630-650 nm for rød fluorescens (enkeltrådig DNA), og 525-530 nm for grønn fluorescens (dobbeltrådig DNA).
3. Antall spermceller fra cauda ble telt, og fortynnet til $1,5 \times 10^6$ sperm/ml i kald TNE-buffer. Alle prøver og løsninger ble holdt på is fra til avlesning.
4. 200 µl sperm-løsning ble overført til et flow-rør som stod på is. 3 parallelle prøver ble laget.

5. AO ekvibreringsbuffer ble kjørt gjennom flow-maskinen i 15 minutter eller mer mens prøvene ble klargjort.

6. Kjøring av prøvene:

400 µl syre-detergentløsning (pH 1,2) ble tilsatt til 200 µl spermløsning (i flow-rør), nøyaktig 30 sekunder etterpå ble 1,20 ml kald AO-fargeløsning tilsatt. Nøyaktig 3 minutter etter tilsetning av syre-detergentløsning ble prøven avlest (record data). Det ble målt 10 000 celler pr prøve, med en flowhastighet på 200-250 celler per sekund (justert for referanseprøven, deretter holdt konstant).

Mellom ulike prøver ble AO-ekvibreringsbuffer kjørt gjennom maskinen, dette var ikke nødvendig mellom ulike paralleller av samme prøve. Etter å ha avlest alle prøvene ble flow-apparatet rensert for å fjerne AO.

2.5 *In vitro* fertilisering

Spermceller isolert 7 dager etter AA-eksponering ble benyttet til *in vitro* fertilisering av oocytter. Som navnet tilsier er dette en metode hvor befruktning av et egg utføres utenfor kroppen. I en petriskål tilsettes spermceller til et egg slik at befruktning kan finne sted. Metoden er beskrevet i (Nagy, Gertsenstein et al. 2003). For å kunne kjøre vellykkede *in vitro* forsøk trengs det stort antall egg og embryo fra mus. Naturlig syklus fører til dannelse av 12-14 embryoer per hunnmus (Schultz 1986). Ved hjelp av hormonbehandling kan antall egg og embryo økes, og ovuleringstid reguleres, dermed kan det dannes grunnlag for et vellykket forsøk. Ulempen med denne manipuleringen er at i alle superovulerings prosedyrer er sett flere preimplantasjon embryoer (ca 12 %) som har søster kromatin utvekslings kromosom-aberrasjoner sammenlignet med embryoer fra normal parring (ca 3,5 %) (Schultz 1986). En måte å holde kontroll på embryokvalitet under slike forsøk er prokjerne-skåring (Depa-Martynow, Jedrzejczak et al. 2007). I denne delen av oppgaven ble det jobbet mye med å forbedre fertiliseringsraten.

Seks hunnmus 4-6 uker gamle ble superovulert med hormonbehandling, først med 5 IU PMSG (pregnant mare serum gonadotropin), og etter ca 48 timer med 5 IU hCG (human choriogonadotropin). Ideelt bør dyr avlives ~13 timer etter hCG injeksjon (Naz, Ahmad et al. 1991). Hormoner ble injisert på kvelden, og dyrene avlivet morgenen etter 5 IU hCG injeksjonen, og eggledere dissekert ut (**Figur 2.1**). Eggledere ble oppbevart i M2-medium (i et

eppendorfrør), og tatt med til labben, hvor egg ble isolert under lysmikroskop. **Figur 2.5** viser skjematisk utløp av metoden.

Fremgangsmåte:

Dag 1: Klargjøring av skåler.

1. IVF: To petriskåler (30 mm) med 250 µl HFT-medium, tildekket med parafin for befruktning. En til kontroll, og en til eksponert sperm.
2. VASK: To petriskåler (60 mm) for vask etter *in vitro* fertilisering, hver med 5 dråper med 200 µl KSOM-medium, tildekket med parafin.
3. DYRKNING: To skåler med en dråpe 100 µl KSOM tildekket med parafin, for dyrkning av eggene etter befruktning.

Skålene ble oppbevart i inkuberingsskap over natt (37°C, 5 % CO₂).

Dag 2:

1. Hannmus (en kontroll, og en AA eksponert i 7 dager) ble avlivet. Cauda ble dissekert ut.
2. Seks hunnmus ble avlivet, og deres eggnøster dissekert ut.
3. Både cauda og eggnøster ble medbrakt i eppendorfrør (med M2-medium) til labben fra dyrestallen.
4. I labben ble spermceller isolert fra cauda og overført til petriskål eller eppendorfrør med 250 µl HTF-medium. Dette ble oppbevart 10 minutter i varmeskap (37 °C) slik at mortile spermceller fikk tid til å svømme opp. Etter ti minutter ble 25 µl spermceller fra øverstelaget overført til IVF skålene.
5. Imens ble egg isolert fra eggnøstene i petriskål med M2-medium.

Isolering av egg: Egglederne ser ut som små nøster. Morgen etter hCG-injeksjon befinner eggskyene seg i en tydelig utposning på egglederen, og med riktig lys i mikroskopet kunne eggene ses gjennom nøstene. Mørk farge i de lyse nøstene indikerte egg. Det ble kuttet hull i eggnøstene hvor man fikk indikasjon på egg. Kuttet ble utført forsiktig med en spiss pinsett, og eggsky strømmet ut. Eggskyen ble munnpipetert til IVF skålen med spermceller.

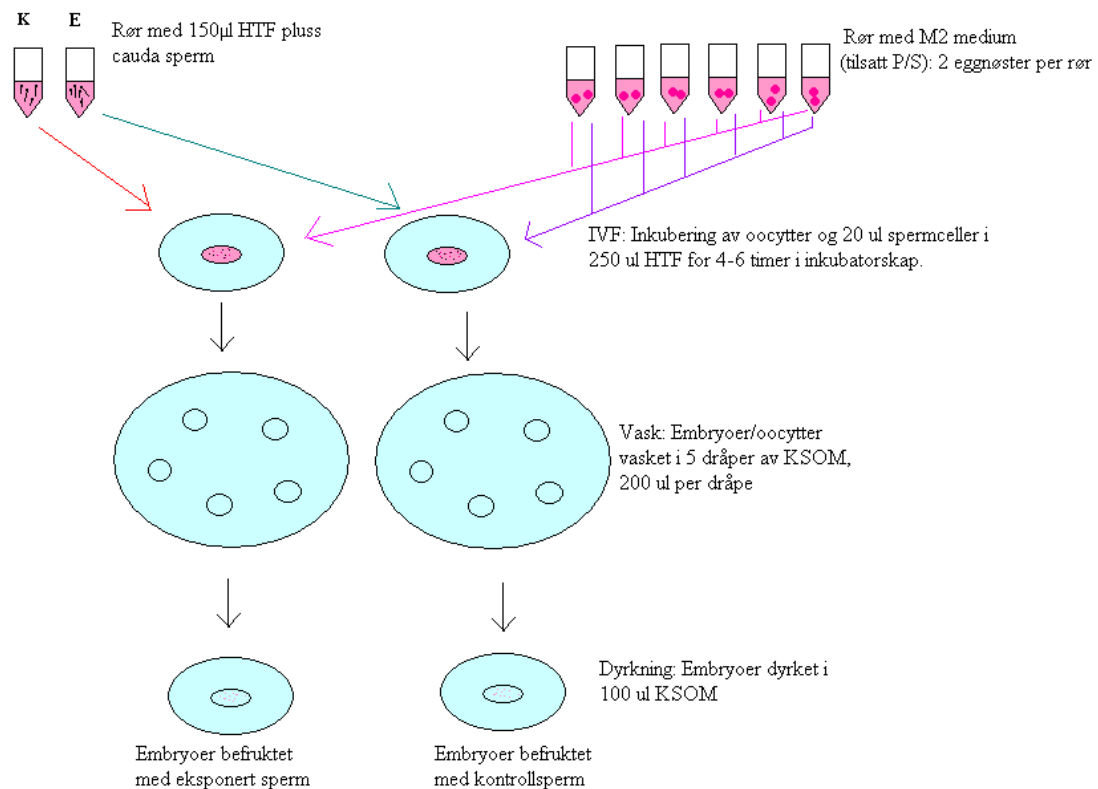
6. Selve befruktningen ble utført i IVF skålene, inkubert 4-6 timer (37°C).
7. Etter befruktning ble det utført vask av eggene. 5 dråper KSOM-medium vask hjalp med å vaske bort kumulusceller og spermceller.
8. Eggene ble overført til dyrkningsskåler og oppbevart i inkubatorskap (37°C, 5 % CO₂).

Dag 3 og 4: Observasjon av embryoutvikling

8. Egg i skåler ble observert under lysmikroskop. En noterte ned antall og kvalitet på egg og embryoer. Det ble observert og notert følgende celletyper; kondensert oocytter, fragmenterte oocytter og ikke befruktede oocytter med normal utseende, 1-cellede embryoer, og delte embryoer (2-celle, 4-celle og 8-celle stadier). Høyt antall celler av følgende celletyper; kondenserte og fragmenterte indikerer unormale eggceller eller ikke frisk utvikling av eggcellene som ble isolert. Ikke normale egg (kondenserte og fragmenterte) og ikke befruktede egg ble munnpipetert ut og kastet.

Dag 4:

Etter to dager ble embryoer munnpipetert ut, og immunfarget for å sjekke induksjon av sentrale DNA-skaderesponsproteiner (p53 og γ H2AX), etter paternell akrylamid-eksponering, metoden er beskrevet i neste kapittel.



Figur 2.5 Oppsett for IVF (In vitro fertilisering). *K* (kontroll) og *E* (eksponert) sperm ble tilsatt i hver sin petriskål, og senere ble det tilsatt eggskyer fra hunnmus, eggsky fra begge eggøstene ble tilsatt i hver sin skål, slik at egg fra samme hunnmus kunne bli befruktet med både kontroll- og eksponert sperm. Sperm og egg ble inkubert for befruktning i 4-6 timer, senere ble eggceller og zygoter vasket i KSOM, og overført til KSOM for dyrkning.

2.6 Immunfarging av oocytter

Immunfarging av oocytter og zygoter/embryoer er beskrevet av Fedorcsák og Storeng (Fedorcsák og Storeng 2003). Embryoer ble støpt inn i fibrinklump for å lette håndteringen av preparatene etter en beskrevet metode (Hunt, LeMaire et al. 1995; Derijck, Heijden et al. 2006). En slik innstøping begrenser antall munnpipetteringer og er dermed både arbeidsbesparende og man reduserer faren for at embryocellene skal løsne fra hverandre eller klistre seg sammen.

Dag 1:

1. Embryo ble vasket i 1 % BSA (løst i PBS) i 10 minutter og deretter raskt via et bad med Tyrodes syre (pH 2,5) til nytt bad med Tyrodes syre for fjerning av zona pellucida. Første bad med Tyrodes syre vasket bort rester av M2-medium som kan forstyrre virkningen av Tyrodes syre. Under andre bad ble det sett under mikroskop at zonan forsvant (ca 30 sekunder). Pipetten ble fuktet med 20 % BSA (løst i PBS). BSA ble brukt til å redusere klebelighet av cellene.
2. Cellene ble overført til 1 % BSA (10 minutter) og deretter til fiksering. *Cellefiksering:* Cellene ble fiksert med paraformaldehyd (3 % paraformaldehyd med 0,2 % Triton X-100) i 15 minutter ved romtemperatur. Dette gav kryssbindende fiksering. Triton X-100 permeabiliserer cellene for å få antistoffene gjennom cellemembranen, og reduserer bakgrunn.
3. Etter fiksering ble cellene støpt i fibrin-klump. Støping ble utført på et dekkglass hvor det ble tilsatt en dråpe fibrinogen (20 µl), så ble cellene tilsatt med munnpipettering, og i samme dråpe ble trombin (7 µl) tilsatt. Fibrin-klumpen fikk stivne, men ikke tørke. Dekkglasset med celler i fibrin-klumpen ble brukt videre. Fibrin-klumpen holdt på cellene, samtidig var cellene tilgjengelige for behandling.
4. Det ble utført blokkering av uspesifikke seter i cellene, ved å overføre cellene til to etterfølgende bad med 2,5 % BSA i PBS, for fjerning av triton/PFA, 30 min per bad eller lenger (lengre oppbevaring ble utført mørkt og kjølig, 4°C).
5. Cellene ble inkubert med primære antistoffer; 200 µl 1 % BSA og 0,1 % tween 20 + antistoff (anti-γH2AX: 1:2000 laget i mus, anti-p53: 1:100 laget i kanin) over natt, mørkt og kjølig, 4 °C. Behandling med antistoff ble utført ved at dekkglasset med fibrin-klumpen ble satt opp ned i en behandlingsdråpe på utklipt parafilmbit.

Dag 2:

6. Neste morgen ble cellene vasket, 3 x 1 % BSA i PBS, 10 min per bad ved romtemperatur.
7. Etter vask ble cellene inkubert med sekundært antistoff; 200 µl 1 % BSA og 0,1 % tween 20 + antistoff (anti-kanin: 1:100, anti-mus: 1 : 100), i 1 time (mørkt ved romtemperatur).
8. Etter inkubering med sekundært antistoff ble cellene vasket 3 x i 1 % BSA i PBS, 10 min per vask. Kjernene ble farget med Topro-3 (2µl Topro-3 i 2 ml 1 % BSA i PBS) i 20 minutter på ristende underlag. Topro-3 er et DNA-fargestoff (Pham, Tamayo et al. 2003; Lin-Lee, Pham et al. 2006). Etter farging ble cellene vasket kort med destillert vann.
9. På et objektglass ble det tilsatt en dråpe Dako monteringsmedium, og dekkglasset med fibrin-klumpen (med celler) ble satt opp ned, slik at cellene kom i mellom dekkglasset og objektglasset. En trykte forsiktig på dekkglasset for å få ut luftbobler.
10. Preparatet ble tørket i 15 minutter eller mer ved romtemperatur før observasjon. Etter tørk ble preparatet oppbevart mørkt og kjølig, 4 °C.

2.6.1 Analyse av immunfargete celler

For analyse av immunfargete celler ble det benyttet konfokalt skanningmikroskop (Leica TCS SP, Leica, Heidelberg, Tyskland), utstyrt med en Argon-laser (488 nm) og to Helium/Neon lasere (543 and 633 nm). For bildetakning ble "Leica Confocal Software" (LCS) benyttet, og et 40x oljeobjektiv. Denne delen av oppgaven ble utført ved Senter for molekylær fluorescensmikroskopi, Rikshospitalet, Oslo. Ansvarlige personer for opplæring og tilgang til senteret var Professor Henrik S. Huidtfeldt og Lene Wierød.

2.7 Statistiske metoder

Det ble anvendt statistisk analyse av kometdata. Formålet med statistikken var å se om forskjellene mellom medianene for kontroller og behandlede spermceller i ulike kometforsøk var statistisk signifikante. Det finnes ingen standard statistisk protokoll for kometdata (Lovell og Omori 2008), men design av kometforsøkene er en viktig del av statistisk analyse (Wiklund og Agurell 2003). For bruk av parametriske tester som analyse av varians (ANOVA) og student t-test, må kriterier som normalfordeling, lik varians og uavhengighet oppfylles (Moore og McCabe 2003). Kometdata har en tendens til ikke å bestå normalfordelingstester, fordi dataene enten er høyre eller venstre-forskjøvet (Lovell og Omori 2008). Det kan benyttes log-transformasjon på høyreforskjøvet data for å få normalfordeling (Moore og McCabe 2003), som videre også kan gi likhet i varians (Lovell og Omori 2008).

Dette er ikke mulig med venstreforskjøvet data. Hvis kriterier for parametriske tester ikke kan oppfylles, må det benyttes ikke-parametriske tester (Moore og McCabe 2003), siden disse ikke krever en fordeling. Kruskal-Wallis test er analog til ANOVA, mens Mann-Whitney test er analog til student T-test. Ulempen med ikke-parametriske tester er at de ikke er like kraftfulle som sine parametriske analoger (Duez, Dehon et al. 2003).

Programmet "Comet Assay IV" ble benyttet til analyse av de isolerte spermkjernene. Det ble skåret ~30 celler per gel, hvor tre og tre geler var parallelle. I alt ble det 4 behandlinger per film med 12 geler. Dette oppsettet gav ~90 kjerneskåringer per behandling per forsøk. Det ble kjørt minst tre uavhengige forsøk med samme oppsett for hver behandling.

Statistisk analyse av DNA-skader i spermceller (spermkomet-data) ble gjort i SPSS v16.0, Stata/SE 9.0, og Microsoft Office Excel 2003. Følgende egenskaper av rådataene og log-transformerte data ble undersøkt:

- Normalfordeling
- Lik varians i ulike grupper

Normalfordeling ble undersøkt i SPSS v16.0 med følgende plotter, og tester:

- Histogram plot
- Q-Q plot (Normal quantil plot)
- Shapiro-Wilk test
- Kolmogorov-Smirnov test

Histogram plot og Q-Q plot brukes til å undersøke fordelingen av data (Moore og McCabe 2003). Shapiro-Wilk test brukes som test på normalitet (Royston 1992) og Kolmogorov-Smirnov test er en statistisk test for analyse av histogrammer (Young 1977). Ved bruk av dataene viste histogram plottene venstre forskyvning i kontrollgruppene. Q-Q plottene for de ulike gruppene viste også en ikke-normal fordeling. Logaritmisk transformering av dataene ga ikke en bedre normalfordeling. Det visuelle inntrykket fra Q-Q plott ble bekreftet med shapiro-Wilk test og kolmogorov-Smirnov test, som begge viste at verken rådataene eller de transformerte dataene var normalfordelte.

For å teste om det var lik varians i ulike grupper ble det benyttet Levenes test (Keyes 1997). Levens test ble utført i programmet Stata/SE 9.0 på både rådata og log transformerte data. Denne testen viste ulik varians i de ulike behandlingsgruppene ($P < 0,05$), både i rådata og log-transformerte data, med unntak av data fra gruppen *in vitro* uten Fpg ($P > 0,05$) (**Tabell 3-1 og 3-2**). Det var derfor mulig å bruke ANOVA på disse dataene, men det ble prioritert å bruke de samme tester på alle behandlingsgruppene. På grunnlag av ikke normalfordelte data, og ulik varians ble de ikke-parametriske testene (Moore og McCabe 2003) tatt i bruk. Følgende ikke-parametriske tester ble benyttet:

- Kruskal-Wallis test
- Mann-Whitney test, også kalt Wilcoxon rank-sum test

I de ikke-parametriske testene ble signifikansnivået satt til 5 %. Det betyr at dersom signifikanssannsynligheten var mindre enn 5 % ($P < 0,05$) ble nullhypotesen forkastet og det ble konkluderte med at gruppene var signifikant forskjellige. I Mann-Whitney test var nullhypotesen at to grupper er fra samme populasjon, og det antas at deres fordeling er lik. Også her ble signifikantnivået satt til 5 %, som senere måtte korrigeres for signifikansnivå med antall gjentatte forsøk. I *in vivo*-forsøkene med Fpg ble $n=5$ benyttet for å korrigere signifikansnivået, uten Fpg var $n=3$. *In vitro* ble n satt til 4, og i tidstrendsforsøkene var $n=3$. Dette ble utført med Bonferroni-korreksjon (Simple Interactive Statistical Analysis (SISA). "Bonferroni Correction Online" 2008). Det er det korrigerte signifikansnivået som ble benyttet for eventuelt å forkaste nullhypotesen i Mann-Whitney test.

3. RESULTATER

3.1 Optimalisering av kometmetoden for måling av DNA-skader i musesperm

Utprøving av sperm fra ulike deler av bitestiklene (caput, cauda og vas deferens) førte til at det ble valgt å bruke caudasperm til kometanalysene. Caputsperm hadde betydelig lavere prosentvis innhold av sperm og ga mye større variasjon i kometmetoden, mens *vas deferens* gav mindre spermutbytte, og noe lavere renhet (~93 % sperm) enn caputsperm (>97 % sperm).

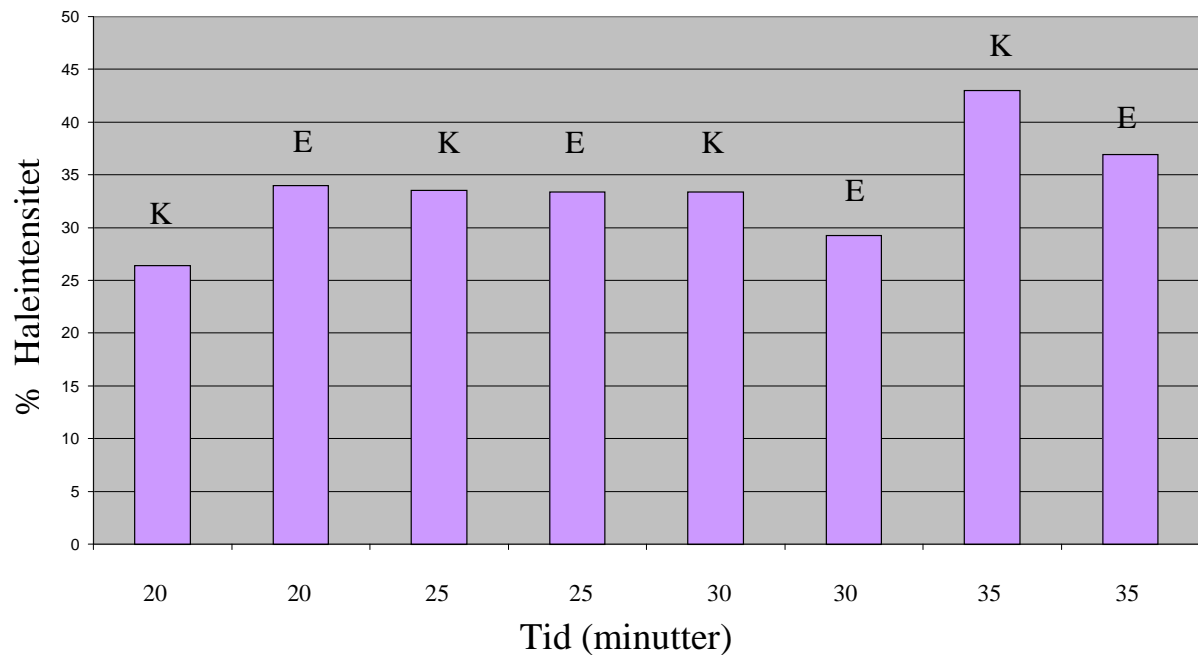
I denne oppgaven har det blitt prøvd ut forskjellige modifikasjoner av kometmetoden for å finne den optimale prosedyren. Følgende parametre ble variert: agarosekonsentrasjonen, lyseringsløsning og elektroforesetid. Utprøvelse av agarosekonsentrasjon (1 %, 1,5 %, 1,7 %, 2 %, 2,25 %, 2,5 %) viste at 1,7 % agarose holdt best på DNA-fragmentene, uten å redusere sensitiviteten av metoden for mye. Høyere agarosekonsentrasjoner enn 1,7 % var vanskelig å jobbe med ettersom gelene stivnet veldig raskt, hvilket gav ujevn støping og førte til at det ble vanskelig å avlese resultatene. Med en agarosekonsentrasjon mindre enn 1,7 % ble det målt høyere bakgrunn i kontrollceller, og mindre forskjeller mellom behandlet og kontroll.

I et forsøk ble det prøvd ut forskjellige variasjoner av lyseringsløsninger. Følgende kombinasjoner ble utprøvd og sammenlignet:

- Lyseringsløsning med 10 mM DDT i 30 minutter ved 4°C, etterfulgt av lyseringsløsning med Proteinase K (100mg/ml) i 1 time ved romtemperatur.
- Lyseringsløsning med 10 mM DDT i 30 minutter ved 4°C, etterfulgt av lyseringsløsning med Proteinase K (100mg/ml) i 3 timer ved romtemperatur.
- Lyseringsløsning med 10 mM DDT i 30 minutter ved 4°C, etterfulgt av lyseringsløsning med LIS i 1 time ved romtemperatur.
- Lyseringsløsning med 10 mM DDT i 30 minutter ved 4°C, etterfulgt av lyseringsløsning med LIS i 3 timer ved romtemperatur.

Dette viste at først lyseringsløsning med 10 mM Dithiothreitol (DTT) i 30 minutter ved 4°C, etterfulgt av lyseringsløsning med Lithium diiosalicylate (LIS) i 1 time ved romtemperatur gav best resultat, med minst bakgrunnsskade i kontrollceller. Basert på disse resultatene valgte vi å benytte en litt modifisert metode beskrevet av Donnelly, McClure et al (1999). Donnelly og medarbeidere benyttet lyseringsløsning (pH 10) uten DTT i 1 time, 4°C, så

lyseringsløsning (pH10) med DTT i 30 minutter, 4°C, etterfulgt av lyseringsløsning med LIS i 90 minutter ved romtemperatur (Donnelly, McClure et al. 1999). Vi la til en halvtime ekstra med LIS etter protokollen til Donnelly og medarbeidere, men valgte å kutte 1 time lysering (uten DDT).



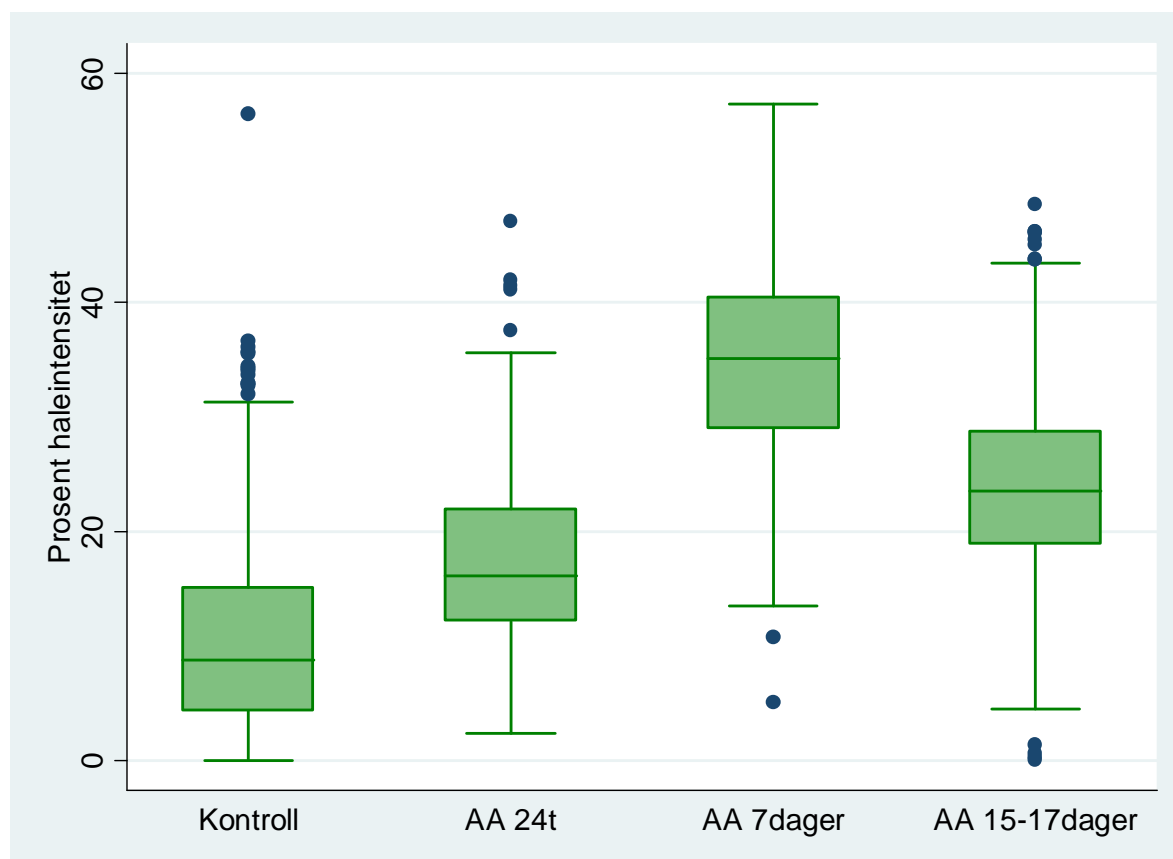
Figur 3.1 *Utprøving av forskjellige elektroforesetider. Det vises % DNA-skade i K (kontrollceller) og E (eksponerte celler, 24 timer) ved forskjellige tider. Dette er resultater fra ett forsøk.*

Ved utprøving av forskjellige tider under elektroforese i ett forsøk viste det seg at kjøring i 20 minutter gav best resultater. **Figur 3.1** indikerer at ved lengre elektroforesetider øker bakgrunnsnivået av skader, spesielt i kontroller. Ut fra avlesning på denne figuren (% haleintensitet) ble det valgt å kjøre elektroforese i 20 minutter.

Forsøkene med å optimalisere kometmetoden innebar forbedringer. Det ble videre vist stor effekt av å håndtere spermcellene svært varsomt. I de tidlige forsøkene der effekter av Fpg-enzymet ble undersøkt (**kapittel 3.3**) er det derfor høyere nivå av bakgrunnsskade enn i senere forsøk med eksponering av ulike cellestadier (tidstrend). Tidstrend forsøkene er beskrevet i neste kapittel.

3.2 Seine spermatider og tidlig spermatozoer gir opphav til størst DNA-skade i sperm etter akrylamid-eksponering

For å finne hvilke stadier i spermatogenesisen som gir opphav til størst DNA-skade i sperm etter akrylamid-eksponering ble spermceller isolert 24 timer, 7 dager og 15-17 dager etter eksponering. Caudasperm ble isolert for å måle DNA-skader i de ulike stadiene ved hjelp av kometmetoden.



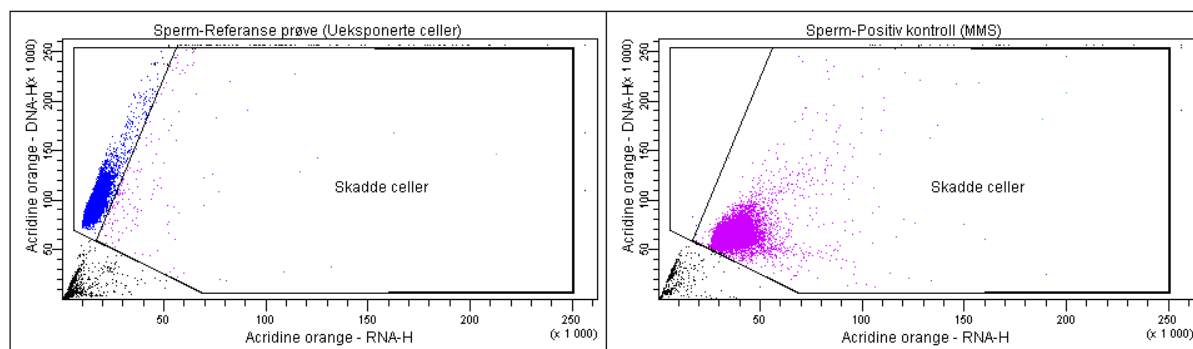
Figur 3.2 DNA-skade i sperm ved forskjellige tidspunkter etter akrylamid(AA)-eksponering (24 timer, 7 dager og 15-17 dager). Resultatet er sammensetning av tre uavhengige forsøk. For Bonferroni-korreksjon under statistisk analyse av data ble det brukt $n=3$.

Tidstrendsforsøkene viser størst skade i sperm analysert 7 dager etter AA-eksponering. Resultatene viser også større skade ved AA-eksponert sperm ved tidspunkter (24 timer, 7 dager og 15-17 dager) sammenlignet med kontroll (**Figur 3.2**). Statistiske analyser viser signifikante forskjeller mellom alle behandlingsgruppene ($P < 0,01667$) (**Tabell 3-1**). Kruskal-Wallis test viser samme signifikante forskjeller ($P < 0,05$), og ikke signifikante forskjeller ($P > 0,05$), som Mann-Whitney testen.

Tabell 3-1 Statistisk analyse av tidstrendforsøkene. Tabellen viser resultater fra to ikke-parametriske tester og Levenes test utført på rådata fra tidstrend forsøkene.

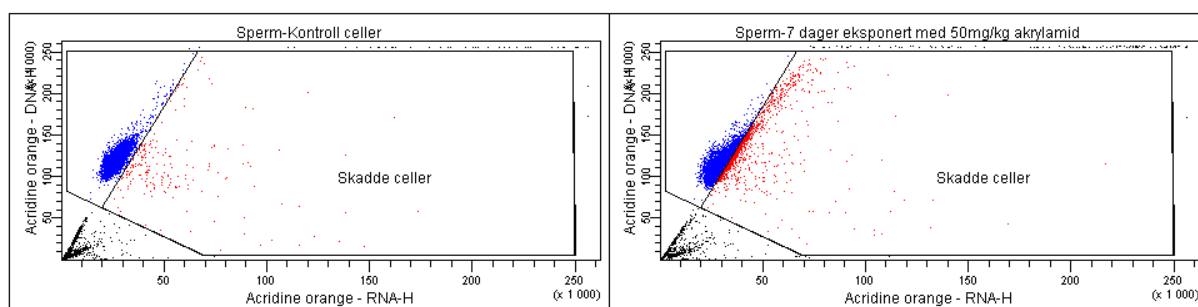
Test	Grupper	p-verdi
Mann-Whitney test (to-gruppe statistikk) H ₀ = Gruppene har lik fordeling Signifikansnivå= 0,05 Bonferroni's korrigert signifikansnivå: Tidstrend: 0,01667	Kontroll-24timer	0,00001
	Kontroll-7 dager	0,00001
	Kontroll- (15-17) dager	0,00001
	24timer- 7 dager	0,00001
	24timer- (15-17) dager	0,00001
	7dager- (15-17) dager	0,00001
Kruskal-Wallis test H ₀ = Gruppene er like Signifikansnivå= 0,05	Alle grupper mot alle	0,0001
Levenes test: Likhet av varians P<0.05 betyr at de ulike variansene er signifikant forskjellige.	Alle grupper mot alle	0,039

Spermceller isolert 7 dager etter AA-eksponering ble analysert for kromatinskade ved bruk av det alternative spermassayet, SCSA. Mens kometmetoden måler fragmentering av DNA, måler SCSA hvor lett spermkromatin blir denaturert ved en kort syrebehandling. SCSA er mye benyttet i kliniske studier for å si noe om human spermkvalitet. Derfor var det ønsket å se om SCSA i likhet med spermkomet ville fange opp akrylamidinduserte spermskader. Parameteren % DFI ble brukt for å uttrykke DNA-skade målt med SCSA. % DFI er mål på % sperm på utsiden av hovedpopulasjonen av en referanse prøve (oversiktsartikkel av Evenson og Wixon 2005). For hvert forsøk ble en referanseprøve brukt til å innstille sonene i programmet "BDFACSDiva". Sonene markerte hovedpopulasjonen av spermceller i referanseprøven og definerte grensen mot spermceller med denaturert DNA (skadde celler) (**Figur 3.3**). I tillegg benyttet vi oss av en positivkontroll (caudasperm fra MMS eksponerte dyr) som kontroll på at denaturerings og fargeprosedyrene fungerte.



Figur 3.3 SCSA-resultater fra referans prøve og fra MMS-eksponert sperm. Referans prøve (ueksponerte spermceller) vises til venstre. Til høyre vises resultat fra MMS-eksponerte spermceller (positiv kontroll).

Referanseprøvene hadde 1-2 % skadde celler, mens positiv kontroll viste opptil 98 % skadde celler (**Figur 3.3**). I tre uavhengige forsøk med SCSA ble det målt 1-3,5 % av kontrollceller i sonen for skadete celler (isolert fra dyr eksponert *in vivo* med PBS i 7 dager). Dette er mindre enn i sperm isolerte fra 7 dagers AA-eksponerte dyr, der mellom 6-16 % av cellene hadde kromatinskade (**Figur 3.4**). Resultatene synes dermed å bekrefte effektene av AA på spermkromatin observert med kometmetoden. Det ble ikke brukt statistiske metoder for å vurdere om forskjellene mellom behandlete og kontrollceller var signifikante. Dette ble ikke gjort fordi den observerte skadefordelingen (skade på hele spermpopulasjonen) tilsier at den mest informative parameteren å bruke er DFI og ikke % DFI. En programvare som kan beregne DFI var ikke tilgjengelig på avdelingen. DFI er et mål på rød fluorescens i forhold til total (rød + grønn) fluorescens.



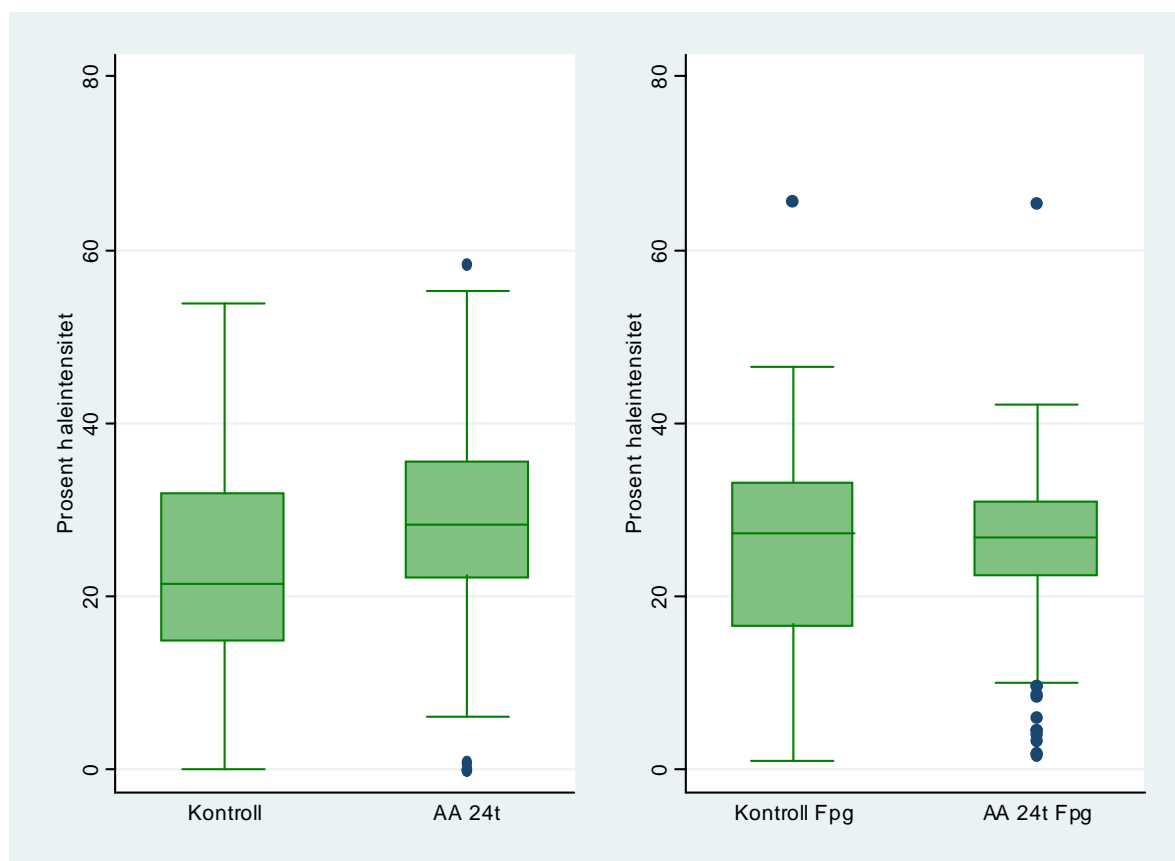
Figur 3.4 SCS- resultater fra kontrollceller og spermceller isolert 7 dager etter *in vivo* 50mg/kg akrylamid-eksponering. Til venstre vises resultat fra kontrollceller, og til høyre vises resultat fra eksponerte celler.

3.3 Dannelse av oksidative DNA-skader etter akrylamid-eksponering.

Det var ønsket å undersøke om akrylamid kan danne oksidative DNA-skader i sperm, derfor ble Formamidopyrimidin DNA-glykosylase (Fpg) benyttet. Fpg er kjent å detektere oksidative DNA-skader i sperm. To forsøkssett ble utført, ett med sperm isolert 24 timer etter *in vivo*

eksponering (**Figur 3.5**), og ett der spermen ble eksponert *in vitro* for den DNA-bindende metabolitten glycidamid (**Figur 3.6**).

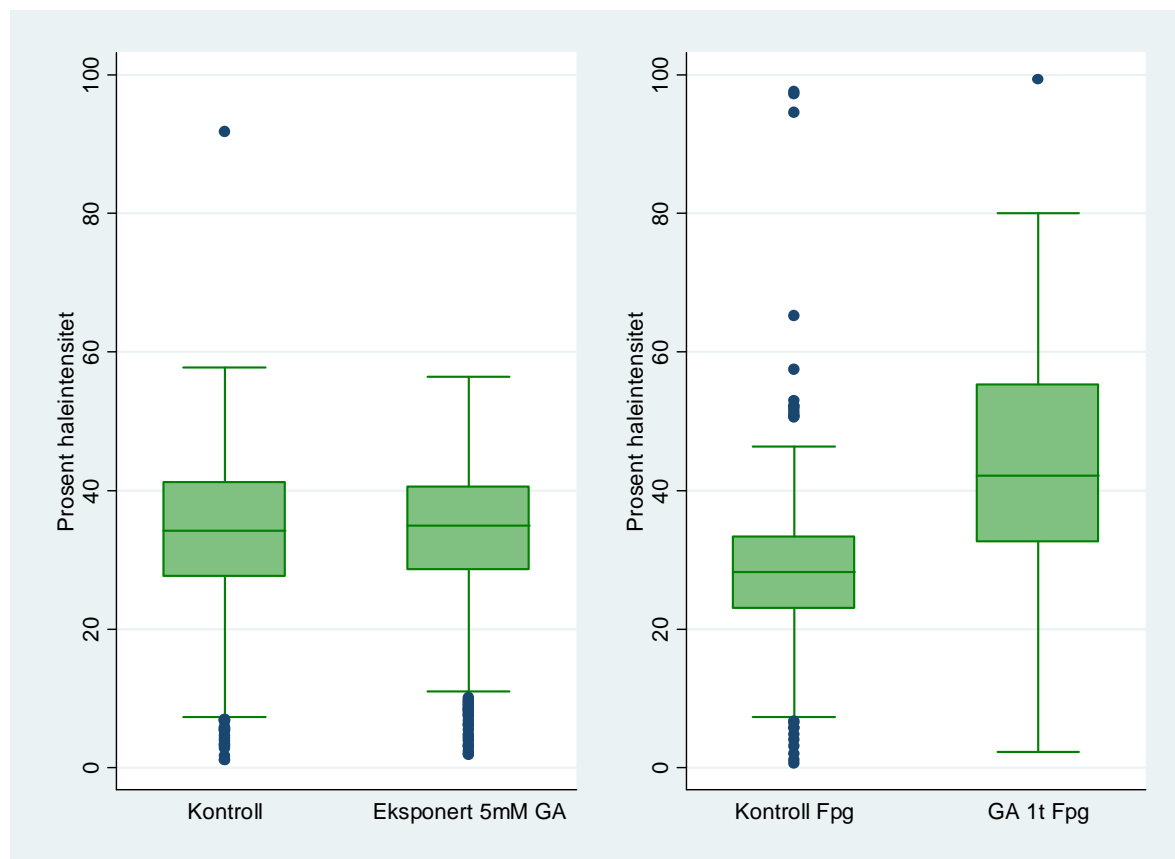
In vivo-forsøkene bekrefter at det er forskjeller mellom sperm fra kontrolldyr og eksponert dyr uten Fpg. Imidlertid synes Fpg å ikke gi noe økning av DNA-skade i sperm fra AA-eksponerte dyr (**Figur 3.5**). Mann-Whitney test med korrigert signifikansnivå viser at spermceller isolert fra dyr *in vivo* 24 timer eksponert med 50mg/kg AA uten Fpg er signifikant forskjellig fra kontrolldyr ($P < 0,01$), mens bruk av Fpg fører til ikke signifikante forskjeller ($P > 0,01667$). Kruskal-Wallis test viser samme signifikante forskjeller ($P < 0,05$), og ikke signifikante forskjeller ($P > 0,05$) (**Tabell 3-2**).



Figur 3.5 Skadenivå i sperm isolert 24 timer etter AA-eksponering (50 mg/kg kroppsvekt). Figuren viser spermceller uten (til venstre), og med Fpg (til høyre). *In vivo* resultatene med Fpg er basert på fem uavhengige forsøk, mens *in vivo* uten Fpg resultater er basert på tre uavhengige forsøk. For Bonferroni-korreksjon i statistisk analyse av data ble det benyttet $n=5$ med Fpg, og $n=3$ uten Fpg.

Tabell 3-2 Statistisk analyse av Fpg-forsøkene. Tabellen viser resultater fra to ikke-parametriske tester, og Levens test utført på rådata fra Fpg-forsøkene.

Test	Grupper (kontroll vs eksponert)	p-verdi
Mann-Whitney test (to-gruppe statistikk) H_0 = Gruppene har lik fordeling Signifikansnivå= 0,05 Bonferroni's korrigert signifikansnivå: <i>In vivo</i> uten Fpg: 0,01 <i>In vivo</i> med Fpg: 0,01667 <i>In vitro</i> forsøk: 0,0125	<i>In vivo</i> uten Fpg	0,00001
	<i>In vivo</i> med Fpg	0,6300
	<i>In vitro</i> uten Fpg	0,7684
	<i>In vitro</i> med Fpg	0,00001
Kruskal-Wallis test H_0 = Gruppene er like Signifikansnivå= 0,05	<i>In vivo</i> uten Fpg	0,0001
	<i>In vivo</i> med Fpg	0,6300
	<i>In vitro</i> uten Fpg	0,7684
	<i>In vitro</i> med Fpg	0,0001
Levenes test: Likhet av varians $P < 0.05$ betyr at de ulike variansene er signifikant forskjellige.	<i>In vivo</i> uten Fpg	0.001
	<i>In vivo</i> med Fpg	< 0.001
	<i>In vitro</i> uten Fpg	0.835
	<i>In vitro</i> med Fpg	< 0.001



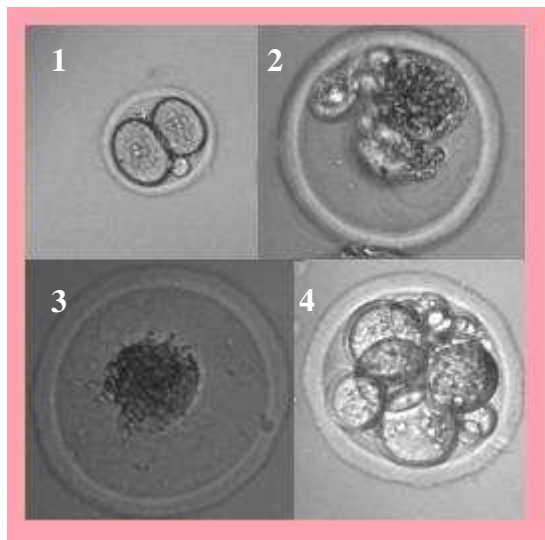
Figur 3.6 *In vitro* 5mM glycidamid eksponert sperm i 1 time. Figuren viser skadenivå i spermceller uten (til venstre) og med Fpg (til høyre). Resultatene er basert på fire uavhengige forsøk. For Bonferroni-korreksjon i statistisk analyse av data ble $n=4$ benyttet.

In vitro-resultatene (**Figur 3.6**) viser ikke signifikante forskjeller mellom kontrollsperm, og sperm eksponert for 5mM GA i 1 time uten påfølgende Fpg-behandling ($P > 0,0125$). Derimot økte skadenivået signifikant i forhold til kontroll, da Fpg ble bruk ($P < 0,0125$) (**Tabell 3-2**).

3.4 Effekter på tidlig embryoutvikling

Oocytter ble befruktet med spermceller isolert fra mus etter 7 dager *in vivo* AA-eksponering, siden dette tidspunktet hadde vist størst skade ved spermkomet. Etter befruktning ble ulike stadier av oocytter/embryoer observert under lysmikroskop (**Figur 3.7**). *In vitro*-fertiliseringsmetoden ble etablert i MIKTs lab under veiledning av forsker Ritsa Storeng fra kvinneklinikken, Rikshospitalet, Oslo. Innledende forsøk med transgene (BigBlue[®]C57/BL/6) hunnmus, av samme genotype som musene brukt i kometforsøkene, viste at oocyttkvaliteten i disse musene var dårlig. Transgene mus ble brukt fordi det er videre ønske om å gjøre studier av slike mus der Ogg1 er slått ut (fungerer som modell for studier av kjemikalieeffekter på humane testikkelceller, som er vist å ha lav kapasitet for fjerning av 8-oksoguanin-addukter). På grunn av dårlig eggkvalitet ble transgene hunnmus byttet med hybridmus (6D2F1), en musestamme som er mye brukt i IVF. Selv etter flere forsøk ble det observert lav befruktningsrate, derfor ble det byttet over også til hannmus av typen 6D2F1. Det har blitt satt i gang en tilbakekryssing av BigBlue[®]C57/BL/6-musene for å krysse ut fragmentene (CII-gen) (som muliggjør mutasjonsanalyse) fordi disse muligens skaper problemer med lav fertiliseringsrate. På grunn av disse fertiliseringsproblemene ble det færre resultater på embryostudiene enn planlagt.

På tross av dårligere datagrunnlag enn ønsket, indikerer summen av tre forsøk at det er forskjeller i tidlig embryoutvikling, men ikke i fertiliseringsraten mellom kontrollembryoer og embryoer fra eksponerte fedre (**Tabell 3-3**). I disse resultatene er det inkludert et forsøk med BigBlue/Ogg1 wt-hannmus og to med B6D2F1-hannmus.



Figur 3.7 Embryoutvikling. Eksempel på **1.** 2-cellestadie embryo **2.** fragmentert oocyt **3.** kondensert oocyt og **4.** 8-cellestadie embryo.

Tallene indikerer en fortere utvikling hos embryo fra eksponert far (**Tabell 3-3**). For eksempel hadde bare 7 % av embryoene nådd 4-cellestadie i kontrollene ved dag 1 etter fertilisering mot 52 % av de eksponerte embryoene. Den økte andelen av embryoer med for rask celledeling var også tilstedet på dag 2 der 7 % av kontrollembryoene hadde nådd 8-cellestadie, mens tallet var opp i 29 % i den eksponerte gruppen. Tallene indikerer også at det er en andel embryoer som har en forsinket utvikling (25 % av eksponerte embryoer mot 4 % av kontrollene).

Tabell 3-3 Embryoutvikling. Tabellen viser tall for fertilisering og celledeling fra tre uavhengige IFV- forsøk.

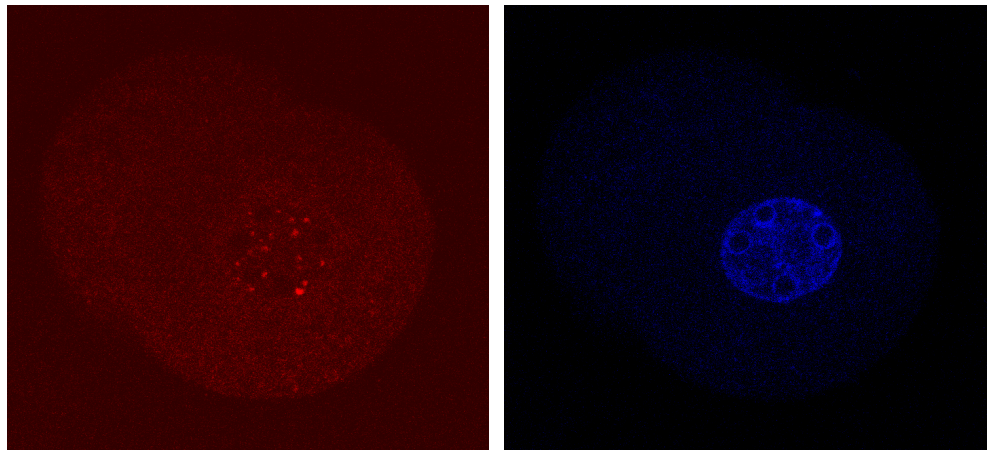
Tid		Dag 1		Dag 2	
Befruktet med		Kontrollperm	Ekspontert sperm	Kontrollperm	Ekspontert sperm
Antall celler (normalt utseende)		138 (100 %)	140 (100 %)		
Ubefruktede oocytter (% av antall oocytter)		109 (79 %)	112 (80 %)		
Befruktede (% av antall oocytter)		29 (21 %)	28 (20 %)	29 (21 %)	28 (20 %)
Embryoer (% av antall befruktede)					
	1-cellestadie	1 (3 %)	7 (25 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
	2-cellestadie	26 (90 %)	9 (39 %)	1 (4 %)	7 (25 %)
	4-cellestadie	2 (7 %)	12 (52 %)	26 (90 %)	13 (46 %)
	8-cellestadie	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (7 %)	8 (29 %)

3.5 DNA-skaderesponsproteiner i embryoer fertilisert med akrylamid-eksponert sperm.

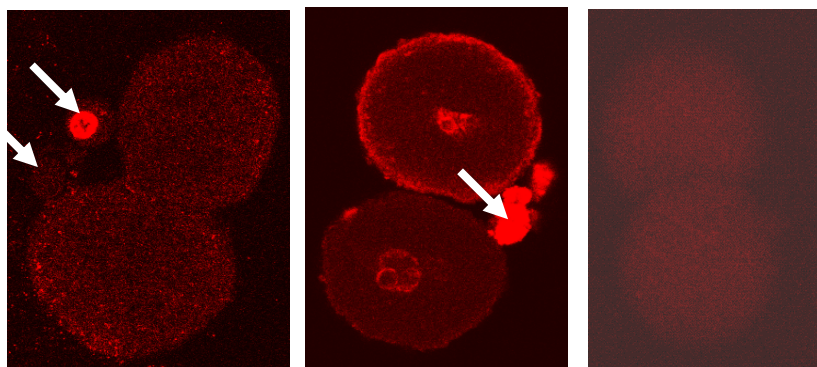
Det er vist at AA-eksponering av hannmus kan føre til preimplantasjonstap (Holland, Ahlborn et al. 1999). Derfor ble det undersøkt uttrykk av 2 sentrale DNA-skaderesponsproteiner, fosforylert histon-protein H2AX og tumorsupressorproteinet p53, ved hjelp av immunfluorescens. Topro-3 ble brukt til kjernefarging ettersom dette stoffet blir eksitert av den lille laseren på mikroskopet og dermed kunne benyttes sammen med både RRX og Alexa488-merkede antistoffer (**Figur 3.8**). I starten ble Hoechst 33258 brukt til farging av kjerner, og dermed ble det ikke tatt kjernebilder i disse forsøkene fordi konfokalmikroskopet ikke var utrustet med UV-laser.

Grunnet problemer med lav fertiliseringsrate, som beskrevet i forrige kapittel, ble det et begrenset antall embryoer tilgjengelig for studier med immunfluorescens. Embryoer og oocytter ble merket med antistoff mot fosforylert H2AX (γ H2AX). Negativ kontroll var celler som ikke ble behandlet med primærantistoff, men kun sekundær antistoff (**Figur 3.9**). Det er beskrevet at det første pollegemet inneholder fragmentert DNA (Munne, Dailey et al. 1995), dermed kan dette fungere som en positiv kontroll for γ H2AX farging (**Figur 3.9**). Oocytter i metafase II viste farging for γ H2AX (ikke vist). I kontrollembryoer (2-cellestadie) ble det observert γ H2AX-merking i noen celler, mens ingen i andre (**Figur 3.9**). Ved sammenligning

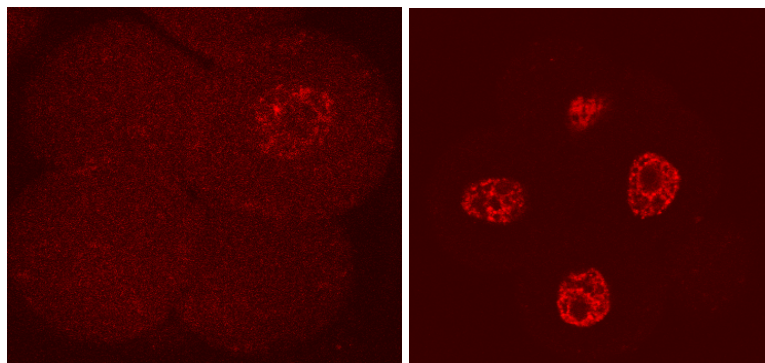
mellom 4-celle embryoer befruktet med kontrollsperm, og de befruktet med sperm fra eksponert far ser man tydeligere γ H2AX-farging i embryoer fra eksponerte spermceller (**Figur 3.10**).



Figur 3.8 Kontroll 2-celleembryo. Bildet til venstre viser γ H2AX-merking, mens bilde til høyre viser toprom-3 kjernefarging.

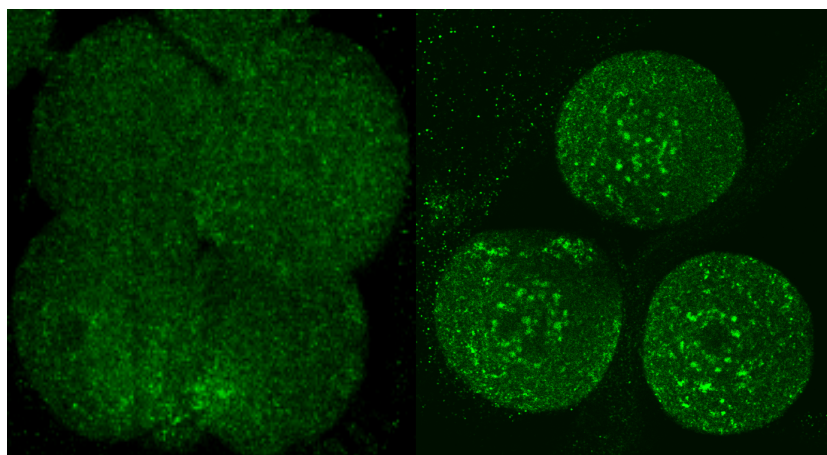


Figur 3.9 2-celleembryo. γ H2AX-merking i kontrollembryo (venstre) og i eksponert embryo (i midten). Høyre bilde viser negativ kontroll (uten primære antistoff). I kontrollembryo ser man γ H2AX-merking av det ene pollegemet, mens det er γ H2AX også i kjernen i det eksponerte embryoet. På begge bildene (venstre og i midten) ser man tydelige pollegemer (pil).

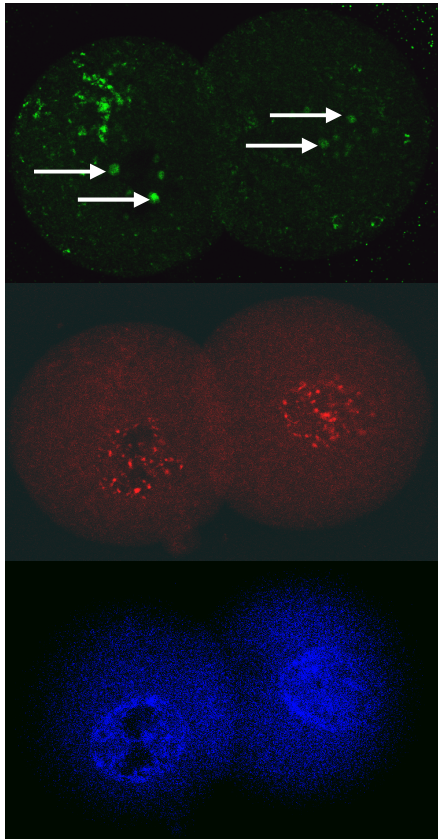


Figur 3.10 4-celleembryo. Bildene viser en kontroll 4-celleembryo (til venstre), og en 4-celleembryo befruktet med sperm fra AA-eksponerte dyr (in vivo 7 dager med 50mg/kg akrylamid) til høyre. Det vises mindre γ H2AX induksjon i kontrollembryo, sammenlignet med i eksponert embryo, hvor man ser tydelig induksjon.

To forsøk ble utført med farging for tumorsupressorproteinet p53. Data for p53 er preliminære, men de antyder induksjon av store p53-foci i kjerner til embryo befruktet med sperm fra mus eksponert 7 dager *in vivo* med 50mg/kg AA. I embryoer befruktet med kontrollsperm synes det å være mindre farging for p53 (**Figur 3.11**). Det var variasjoner i forskjellige celler, men man observerte samme tendens, hvor γ H2AX og p53 induseres i større grad i embryoer fra AA-eksponert far (**Figur 3.12**), sammenlignet med kontroll.



Figur 3.11 4-celleembryo. Bildet viser 4-celleembryo befruktet med kontrollsperm til venstre. Til høyre vises del av 4-celleembryo befruktet med sperm isolert 7 dager etter in vivo eksponering av mus med 50 mg/kg akrylamid. Det vises induksjon av p53 i eksponert embryo (høyre), men ikke i kontrollembryo (venstre).



Figur 3.12 Bildeserie av et 2-celleembryo fra AA-eksponert far. Øverst vises farging av p53 (pilene viser p53-foci i kjernen). I midten vises γ H2AX farging, mens nederst vises kjernefarging med topro-3.

4. DISKUSJON

I denne oppgaven er det studert mulige reproduktive effekter av akrylamid (AA) i mus. I det siste århundre har det skjedd store framskritt innenfor manipulering av reproduksjon og utvikling hos pattedyr. Mus er og har vært en billig og veldig brukbar modell både for testing av stoffers påvirkning på reproduksjon og for mekanismebaserte studier (Mukaida, Wada et al. 1998; Awwad, Sayegh et al. 1999; oversiktsartikkel av Cooke og Saunders 2002). Dette skyldes til dels likheter mellom det humane genomet og genomet til gnagere (Lercher, Williams et al. 2001; Hasty, Campisi et al. 2003). Det er mulig å optimalisere musemodeller ved for eksempel å etablere transgene musestammer med defekter i enzymer som deltar i DNA-reparasjon (Friedberg og Meira 2006). Et eksempel på en slik musestamme er OGG1-defekte mus som brukes hyppig på vår avdeling. Denne musestammen har defekt 8-oksoguanin-DNA-glykosylase, og har blitt brukt som modell for gentoksiske responser i human testikkel, på grunn av tidligere indikasjoner på mangelfull reparasjon av oksiderte puriner i testikkelceller fra mennesker i forhold til gnagere (Olsen, Duale et al. 2003).

I eksperimentene gjort i denne oppgaven ble mus eksponert én gang med AA i en dose på 50 mg/kg kroppsvekt. De fleste forsøkene som er gjort for å studere effekter av paternell AA-eksponering på tidlige embryoer har brukt enten en enkeltdose på 125 mg/kg eller 5 doser av 50 mg/kg over 5 dager. Laveste kjente NOEL (No observed effect level), intraperitonealt for AA hos mus er på 10 mg/kg kroppsvekt per dag (Holland, Ahlborn et al. 1999). Dette er likevel en betydelig høyere AA-eksponering enn forventet i den generelle befolkning (Dybing og Sanner 2003). Skulle forsøkene kjøres med doser som den generelle befolkningen eksponeres for, hadde det vært behov for å eksponere forsøksdyrene daglig over veldig lang tid for å kunne se noen effekter, hvilket ville være kostbart, tidkrevende og uetisk sett fra et dyrevernsynspunkt. I forskning bruker man derfor gjerne høyere doser for å studere mekanismer og endepunkter samtidig som man oppnår resultater raskere, hvilke bidrar med viktig informasjon innenfor forebyggende medisin.

4.1 Måling av DNA-skader i sperm

Det ble jobbet spesielt med kometmetoden i denne oppgaven for å gjøre oss i stand til å måle nivået av DNA-skade i sperm etter AA-eksponering hos mus. Kometmetoden måler DNA-skader i form av trådbrudd i enkeltceller. Metoden er enkel, sensitiv, allsidig, pålitelig og lite kostbar. Metoden brukes i stor grad på vår avdeling. En ulempe er at metoden er basert på

fluorescensmikroskopi ved at noen hundre til noen tusen celler (avhengig av forsøk) analyseres manuelt ved hjelp av et CCD-kamera og et spesielt bildeanalyseprogram. Dette gjør metoden tid- og energikrevende. En annen ulempe er at det finnes variasjoner mellom laboratorier i utførelsen av kometmetoden (Klaude, Eriksson et al. 1996; Olive og Banáth 2006). I teorien er det mulig å bruke kometmetoden på alle eukaryote celler, eventuelt med modifikasjoner avhengig av cellene man ønsker å studere.

SCSA er en metode basert på flowcytometri. Sammenlignet med kometmetoden er SCSA en betydelig vanligere metode for å måle DNA-skade i sperm, ved at det er etablert en detaljert protokoll som gjør at SCSA kan benyttes i kliniske sammenheng. SCSA blir derfor ofte brukt som indikator på menns spermkvalitet (oversiktsartikkel av Evenson og Wixon 2005). SCSA måler enkelt- og dobbelttråddbrudd i sperm (Ramos og Wetzels 2001). Generelt anser man at resultater fra en metode styrkes dersom man finner tilsvarende resultater med en annen metode. I likhet med kometmetoden måler også SCSA DNA-skade i enkeltceller. Metoden er standardisert, rask og effektiv, og man får målt tusenvis av celler på bare noen få minutter. SCSA er dessuten lite kostbar, har god reproduserbarhet og er lett å utføre. En ulempe med denne metoden er at den ikke kan gi spesifikk informasjon om typer av DNA-skader, slik som man kan oppnå ved den modifiserte kometmetoden. Kometmetoden kan kombineres med spesifikke enzymer, som for eksempel Fpg for å måle forekomsten av skadetyper som Fpg har affinitet for.

I denne oppgaven ble kometmetoden brukt blant annet til å måle DNA-skader i forskjellige stadier i spermatogenesisen, og en del av disse resultatene ble så styrket ved bruk av SCSA.

4.1.1 Optimalisering av kometmetoden for måling av DNA-skader i musesperm

Kometmetoden brukt på sperm, slik den ble utført i denne oppgaven, ble optimalisert ved systematisk å søke etter de forholdene som ga best respons samtidig som nivået av bakgrunnsskader ikke ble for høyt. Ved utprøving av varierende agarosekonsentrasjonen ble det funnet at 1,7 % agarose fungerte best. Høyere konsentrasjoner ga store variasjoner i celleskade, både i hver enkelt gel og i parallellene, mens ved lavere agarosekonsentrasjoner ble det målt høy DNA-skade uansett behandling. Ved lave agarosekonsentrasjoner ble det til og med observert høyere nivå av DNA-skader i kontrollceller enn i behandlede celler. En

mulig forklaring på dette er at sterkt fragmentert DNA kan tenkes å gå tapt under elektroforesen i de mer skadde behandlede cellene ved lav agarosekonsentrasjon.

DNA er betydelig tettere pakket i sperm enn i andre celler, og modifikasjoner i blant annet lyseringsforhold er nødvendig for analyse av DNA-skade i sperm med kometmetoden. I litteraturen finner man flere varianter av spermkomet (Haines, Marples et al. 1998; Morris, Ilott et al. 2002; oversiktsartikkel av Lewis og Agbaje 2008). Mange benytter nøytral komet til spermanalyser, noe som gir mindre bakgrunn, men også lavere sensitivitet. Derfor ble det valgt å bruke alkalisk komet på sperm. Ved utprøving av lyseringsløsninger ble det målt stor bakgrunnsskade ved bruk av proteinase K. Dette stemmer godt med funn av Lewis og kolleger (oversiktsartikkel av Lewis og Agbaje 2008), som i sine tidligere studier benyttet seg av en høy konsentrasjon av proteinase K (100 mg/ml) over natt. De oppdaget at dette ikke førte til at spermcellene ble lysert godt nok, og samtidig ble det induisert DNA-skader i nivåer på opptil 25 % i kontrollceller.

DNA i sperm er ekstra godt pakket på grunn av disulfidbindinger i og mellom protaminene bundet til DNA (Balhorn 1982), og man er nødt for å bryte disse kovalente disulfidbindingene for å oppnå at DNA blir tilgjengelig for elektroforese. Vanlig lysering er ikke godt nok til å løsne protaminene fra hverandre. I oppgaven ble det derfor brukt to lyseringssteg. Den første løsningen inneholdt DTT (1,4-Dithiothreitol) og Triton X-100, som er en ikke-ionisk detergent (Szczzygiel og Ward 2002), det betyr at den ødelegger membraner og gjør det mulig for DTT å entre spermkjernen (Haines, Marples et al. 1998). DTT reduserer -S-S-bindingene (disulfidbroene) mellom protaminene til SH-grupper, og holder SH-gruppene i redusert tilstand, noe som hindrer oksidering tilbake til -S⁺, som kan danne ny binding med en annen -S⁺. Reduksjon av disulfidbindingene fører til at protaminene slipper tak på hverandre og på DNA. En del proteiner vil alltid være igjen, og noen velger å behandle lyserte celler med proteinase K i tillegg (etter DTT-behandling), for å bryte ned mer av proteinet bundet til DNA. Risikoen ved å bruke proteinase K er som nevnt over høyere bakgrunnsskade, hvilket også var grunnen til at det heller ble valgt å bruke Lithium 3,5-Diiodosalicylate (LIS) i det siste lyseringssteget. LIS er en mild "kaotropisk" forbindelse (Naz, Ahmad et al. 1991). Hovedfunksjonen til LIS er å øke løseligheten til hydrofobe proteiner i vandige løsninger, og metoden er blant annet brukt til å studere membranproteiner (Marchesi og Andrews 1971; Musil, Carr et al. 1988). LIS i våre forsøk er brukt for å denaturere proteiner og holde dem i løsningen.

Etter lysering ble cellene behandlet med elektroforesebuffer (pH 13,2) i 20 minutter. Høy pH i elektroforesebufferen gjør at hydrogenbindinger mellom basene brytes, og DNA-trådene kan da gå fra hverandre slik at man får enkeltrådet DNA. I tillegg vil en del andre skadetyper (AP-seter) som er ustabile ved høy pH (alkalilabile) konverteres til enkelttråddbrudd. AP-seter dannes relativt hyppig av diverse gentoksiske stoffer (Collins, Dobson et al. 1997; oversiktsartikkel av Collins, Cadet et al. 2004). Ved utprøving av elektroforesetid viste det seg at ved kjøring i mer enn 20 minutter utjevnes forskjeller mellom sperm fra kontrolldyr og sperm fra dyr eksponert med AA i 24 timer (**Figur 3.1**). Ved 35 minutters elektroforese så man at kontrollsperm viste mer skade enn eksponert. En mulig forklaring på tilsynelatende høyere DNA-skade i kontrollceller kontra behandlede, er som tidligere foreslått, at små DNA-fragmenter forsvinner så langt ut i gelen at disse ikke lenger fanges opp av systemet. Denne antagelsen skal undersøkes nærmere ved hjelp av andre metoder.

Kometanalysene av sperm viste høyere bakgrunnsskade enn komet utført på mange andre celletyper, men det er ikke helt forstått hva som er årsaken til dette. Det er kjent at spermatozoer kan bli dekondensert *in vitro* dersom man inkuberer dem med et reduserende stoff, som for eksempel DTT (oversiktsartikkel av Hales, Aguilar-Mahecha et al. 2005). Høyere bakgrunnsskade kan være en bieffekt av dekondensering og sterk lysering, eller en indikasjon på høyt innhold av alkalilabile seter i spermkromatin.

På tross av problemer med bakgrunn og mulig tap av DNA-fragmenter ga den modifiserte kometmetoden oss et verktøy som kan brukes på mus sperm, det vil si mulighet til å detektere DNA-skader forårsaket av en AA-dose på 50 mg/kg. Utprøvingen fram til denne metoden ga oss økt kunnskap om spermcellers sensitivitet. Det kom fram at mus sperm er utrolig sensitiv og må behandles varsomt for å unngå skade. I disse optimaliseringsforsøkene ble det målt signifikante økninger i DNA-skade etter AA-eksponering av spermatozoer. Heller ikke i AA-behandlede spermceller er det klart hva slags skadetyper som måles, og om de er forårsaket av protein-addukter (protamin-addukter) eller DNA-addukter. Det er kjent at høy skade i DNA representert av kometmetoden indikerer enten høy skade eller ueffektiv reparasjon (Collins, Dobson et al. 1997).

4.2 Stadier i spermatogenesisen som er assosiert med høyest nivå av DNA-skader i sperm etter akrylamid-eksponering

I løpet av spermatogenesisen vil kjønnscellene vise forskjellig mottagelighet for skadelige kjemikalier (oversiktsartikkel av Hales, Aguilar-Mahecha et al. 2005). I oppgaven er det brukt caudasperm for å måle DNA-skader. Det ble dissekert ut cauda 24 timer, 7 dager og 15-17 dager etter eksponering for AA. Etter 24 timer isoleres spermceller som er eksponert mens de er i corpus eller cauda (spermatozoer). Etter 7 dager måles det skader i celler som var i caput ved eksponering, altså seine spermatider/ tidlige spermatozoer. Etter 15-17 dager er det spermatider som har blitt eksponert. Resultatene viste topp skadenivå 7 dager etter eksponering.

Det er vist at DNA-reparasjonsevnen avtar med modning under spermatogenesisen (Marchetti og Wyrobek 2008). I tillegg antar man at modne spermceller er lite mottagelige for direkte DNA-skader på grunn av tettpakkingen av kromatin. Forklaring på høyest målt nivå av skade etter 7 dager eksponering kan være en kombinasjon av at 24 timer eksponerte spermatozoer har mer tettpakket kromatin enn caputsperm, og dermed er bedre beskyttet mot skade, mens 15-17 dager gamle spermatider klarer å reparere noen av skadene innen de når cauda. I tidlige spermatozoer kan AA danne addukter med frie sulfhydryl grupper (-SH) i cystein i umodne protaminer og dermed blokkere normal dannelsen av disulfidbindinger som bidrar til tettpakking (Sega, Alcota et al. 1989). Maksimalt nivå av DNA-skade målt ved kometmetoden i denne oppgaven samsvarer med det tidspunktet der det er høyest nivå av AA-protamin-addukter (Sega, Alcota et al. 1989). Nivået av GA-DNA-addukter er vist å være jevnt i denne tidsperioden (Generoso, Sega et al. 1996).

Det er kjent at både AA og hovedmetabolitten GA kan fordeles systemisk i kroppen og nå kjønnsceller (oversiktsartikkel av Dearfield, Douglas et al. 1995). Halveringstiden ved en AA-dose på 50 mg/kg er funnet å være 0,73 timer for AA, og 1,9 timer for GA (Twaddle, McDaniel et al. 2004; Doerge, Young et al. 2005). Sånn sett skal mye av AA være eliminert via urinen 24 timer etter eksponering. Det er kjent at AA og dets metabolitter akkumuleres i testis (oversiktsartikkel av Carere 2006). Når det observeres AA-induserte DNA-skader både etter 24 timer, 7 dager og 17 dager stemmer det godt overens med funn av Marlowe og medarbeidere (Marlowe, Clark et al. 1986). De benyttet helkroppsautoradiografi på mus eksponert med merket AA, og de fant at AA ble transportert gjennom testis og sædledere med samme hastighet som spermatider beveget seg. Dette viser at når AA først bindes til seine

spermatider så forblir det bundet (Marlowe, Clark et al. 1986). I tillegg til at våre resultater bekrefter disse funnene, understøtter de også at AA og GA bundet til spermceller medfører DNA-skader, som er målbare med spermkomet. Resultatene viser også at det ikke er en subpopulasjon av spermcellene som er skadet, men at hele populasjonen får et økt skadenivå.

Vi ønsket å sjekke om caudasperm er sensitiv overfor GA-induserte DNA-skader (*in vitro*). Derfor inkuberte vi caudasperm for 5mM glycidamid (GA) i en time. Det ble ikke målt noen økning i DNA-skader hos behandlede celler sammenlignet med kontroll, selv om 5mM GA er en høy dose. Vi målte signifikant økning av DNA-skade i *in vivo* 24 timer AA eksponert spermceller, som også er caudasperm under eksponering. Grunnen kan være forskjeller i eksponeringstid (1 time GA-eksponering *in vitro*, og 24 timer AA-eksponering *in vivo*). *In vitro* eksponering er uansett med på å bekrefte at spermatozoer ikke er så mottagelige for GA-induserte DNA-skader (Generoso, Sega et al. 1996).

SCSA ble anvendt for å bekrefte funn av skader i AA-eksponert caudasperm. I SCSA ble det brukt sperm fra dyr eksponert for en høy dose MMS som positiv kontroll, dette viste opptil 98 % skade. MMS passer godt som positiv kontroll, siden MMS er kjent for å danne addukter med cystein –SH grupper i sperm-protaminer (Evenson, Jost et al. 1993). I tre uavhengige forsøk målte SCSA i kontrollceller < 3,5 % DFI, og i AA-eksponerte celler ble det målt 6-16 % DFI. I utgangspunktet ble SCSA-metoden benyttet for å se om den er et brukbart alternativ til komet for å måle akrylamid-indusert spermskade og for å forsterke resultater fra kometforsøkene (tidstrend forsøkene). Det ble utført ett SCSA-forsøk med 24 timers eksponerte spermceller, men dette viste ingen nevneverdig økning av DNA-skader i eksponerte celler. Ut fra dette ble det valgt å kjøre SCSA bare på sperm isolert syv dager etter AA-eksponering *in vivo*, siden dette hadde vist størst DNA-skade i kometanalysen. Det er kjent at SCSA bare fjerner noen histoner fra DNA, mens spermkomet antas å fjerne det aller meste av kromatinassosierte proteiner (histoner + protaminer) (Shaman og Ward 2006). Dette kan forklare hvorfor det ikke ble målt nevneverdige forskjeller med SCSA i spermceller isolert fra dyr AA-eksponert *in vivo* i 24 timer, sammenlignet med kontrollsperm. SCSA-resultatene er med på å bekrefte at det er ustabilitet i kromatin i sperm isolert 7 dager etter AA-eksponering. Imidlertid er det ønskelig med høyere følsomhet for å kunne måle skader i AA-eksponert sperm. SCSA er optimalisert for human sperm som har et lavere innhold av protamin-proteiner enn musesperm. Det er derfor mulig at man kan øke følsomheten i

metoden brukt på musesperm ved å optimalisere denatureringen, det vil si muligens noe kraftigere denaturering. Det kan man oppnå ved å øke tiden i syre-denaturering.

4.3 Dannelse av oksidative DNA-skader etter akrylamid-eksponering

Mønstret av DNA-lesjoner gjenkjent av Formamidopyrimidin DNA-glykosylase (Fpg), er kjent å reflektere blant annet oksidative DNA-skader, som for eksempel 8-oksoguanin (Collins, Dobson et al. 1997). 8- oksoguanin er blant de oksiderte basene som er mest studert. Denne basen dannes med høy frekvens og gir opphav til mutasjoner (oversiktsartikkel av Grollman og Moriya 1993). Det finnes indikasjoner på at AA-eksponering kan føre til oksidative DNA-lesjoner på guanin. En mulig mekanisme er induksjon av oksidativt stress sammen med glutationtømming som kan føre til økt dannelse av 8-oksoguanin i behandlede celler (Puppel, Tjaden et al. 2005; Jiang, Cao et al. 2007).

I denne delen ble Fpg-behandling benyttet i kombinasjon med spermkomet både *in vivo* (24 timer med 50mg/kg AA) og *in vitro* (1 time med 5mM GA). Resultatene viser at det introduseres Fpg-sensitive DNA-skader etter eksponering for GA *in vitro* i en time, men ikke etter 24 timers *in vivo* eksponering med AA. Det er sannsynlig at den effektive dosen av GA (etter metabolisering av AA), som når fram til målcellen *in vivo* i løpet av eksponeringstiden (24 timer) er liten sammenlignet med GA-dosen brukt *in vitro*, slik at eventuelle skader ikke er målbare. Eksponering *in vivo* er langt mer kompleks enn *in vitro*, ved at effektiv konsentrasjon av GA påvirkes av opptak, distribusjon og metabolisme av AA, i et samspill av både aktiverende og beskyttende enzymer. Svært viktig er det også at det ikke er klarlagt hvilke skadetyper indusert av GA som faktisk måles ved bruk av Fpg i spermkomet. Dette skyldes at Fpg ikke bare gjenkjenner 8- oksoguanin, men også apurine- og apyrimidine-seter, pluss ring-åpnede puriner. Fpg induserer trådbrudd også ved slike DNA-modifikasjoner, som kan initielt stamme fra N7-guanin-addukt (Baum, Loepky et al. 2008). Alle disse skadene er målbare med komet (Klaude, Eriksson et al. 1996; Olive og Banáth 2006).

Våre resultater viser at GA induserer Fpg-sensitive lesjoner hos mus *in vitro*. Det ble brukt en høyere eksponeringsdose av GA enn forventet hos den generelle befolkningen via AA i mat, hvilket for øvrig er vanlig i dyreeksperimenter av denne typen. Målinger tyder på at AA elimineres langsommere i mennesker enn i rotter (Calleman 1996). Selv om dosen i museeksperimentene våre var svært høy, og det er forskjeller i AA-metabolisme hos gnagere

og mennesker (Sumner, MacNeela et al. 1992; Dybing og Sanner 2003; Fennell, Summer et al. 2005; Fennell, Sumner et al. 2006; Fuhr, Boettcher et al. 2006), vil resultatene ha betydning for risikovurdering av AA om den reprotoksiske effekten er forårsaket av direkte DNA-skader (GA-DNA-addukter) eller indirekte DNA-skader (via oksidativt stress). Studier med Fpg skal følges opp i videre forsøk, der det vil bli målt skade i sperm fra Ogg1-defekte dyr ved ulike tider etter AA-eksponering. Slike forsøk vil forhåpentlig si noe mer om eventuell betydning av 8-oksoguanin-addukter.

4.4 Effekter på tidlig embryoutvikling

Den genetiske arven til avkommet avhenger logisk nok av integriteten til DNA både fra en spermcelle og et egg, med like stor vekt på hannens tilskudd av DNA-skader som hunnens. I denne delen av oppgaven ble det brukt spermceller fra hannmus 7 dager etter eksponering for AA *in vivo*, siden slike hadde vist høyest nivå av DNA-skader. Et av målene med oppgaven var å etablere *in vitro* fertilisering i lab'en. Vi oppnådde lav fertiliseringsrate som forklart før (**kapittel 3.4**). Lav fertiliseringsrate gjorde at datamaterialet for studier av embryoutvikling og uttrykk av stressproteiner ble mindre enn planlagt. Arbeid i denne delen av oppgaven har bidratt til en etablert *in vitro* fertiliseringsmetode i vår lab. Resultatene som kom ut av embryostudiene viser imidlertid interessante tendenser.

Det ble ikke observert forskjeller mellom befruktningsraten fra eksponerte spermceller sammenlignet med kontrollceller. Dette stemmer godt med at spermceller beholder sin befruktningssevne selv med et relativt høyt nivå av DNA-skader (Ni, Liu et al. 1997; Lopes, Jurisicova et al. 1998; Irvine, Twigg et al. 2000).

Observasjon av embryoutvikling ga en indikasjon på at en andel av embryoene befruktet med eksponert sperm utviklet seg fortere enn kontroller. Denne tendensen er bekreftet i senere forsøk, og dette er ikke det en ny oppdagelse, for det er vist at kjemisk eksponering av far kan føre til at RNA-syntese foregår raskere i 1-celle embryoer sammenlignet med kontroll (oversiktsartikkel av Hales, Aguilar-Mahecha et al. 2005), men mekanismen bak dette er ikke helt forstått. Etter fertilisering skjer dekondensering av spermcellen (Naish, Perreault et al. 1987). *In vivo* er hele dekondenseringsprosessen karakterisert ved reduksjon av protamin-disulfidbindinger etterfulgt av degradering av disse kjerneproteinene og erstatning med histoner. Som kometmetoden og SCSA viser, har sperm isolert 7 dager etter AA-eksponering

mer skade sammenlignet med kontroll. En mulig effekt av dette kan være at AA-protamin-addukter hindrer normal kondensering av DNA i løpet av spermatogenesis, som dermed bidrar til en raskere dekondensering av spermDNA i occyten etter fertilisering. Dette kan gi slike embryoer en raskere utvikling. Det vil være forskjeller i skadenivå i spermceller fra samme mus, dette kan forklare hvorfor det bare er noen embryoer (52 % på dag en, og 29 % på dag to) som utvikler seg fortere enn normalt.

Det observeres også at det er en andel embryoer fra eksponert far som utvikles saktere enn kontroller. Det er kjent at hannmus behandlet med alkylerende forbindelser kan føre til forsinket utvikling av embryo (Holland, Ahlborn et al. 1999). Holland og medarbeidere, fant forsinket celledeling og arrest av encellede zygoter som en signifikant effekt av paternell AA-eksponering. Skader som eksisterer i spermcellen kan repareres i zygoten for ikke å føre til mutasjoner eller kromosomforandringer i embryoet. Slik reparasjon er forventet i løpet av første celledeling (oversiktsartikkel av Jaroudi og SenGupta 2007), og kan antageligvis bidra til forsinket gjennomgang av første S-fase. En annen mulig forklaring på forsinkelse av utvikling kan være et ikke veletablert zygotegenom, som fører til forsinkelser i utviklingen helt til zygotegenomet er etablert og aktivert.

AA-eksponering fører til både protein-addukter og DNA-addukter. Men det er ennå ikke helt klart om det er protein- eller DNA-adduktene som fører til reproduksjonstoksisitet. Det antas at begge addukt-typer kan påvirke spermDNA, og bidra til embryotoksisitet. Det er faktisk vist for enkelte dominante sykdommer, at hannen bidrar mer til arvelig risiko for *de novo* (nydannede) mutasjoner i avkommet enn hunnen. Dette kan skyldes høyere antall mitotiske celledelinger (med tilhørende replikasjonsfeil) som finner sted under spermatogenesis sammenlignet med oogenesis (oversiktsartikkel av Crow 1997), mens i noen tilfeller er det vist ikke å kunne være forklaringen. I tillegg er det vist at AA og GA kan hemme det mikrotubuliassosierte proteinet kinesin og denne egenskapen kan tenkes å bidra til de klastogene effektene av AA/GA (Friedman, Zeiger et al. 2008). Mekanismen bak kinesinhemming er blant annet forstyrrelse av ATP-produksjon og binding til dette proteinet, som blant annet kan påvirke meiose/mitose.

Videre skjebne til embryoet vil avhenge reparasjonsevnen. Det antas at oocytter/ embryoer er effektive i DNA-reparasjon sammenlignet med spermceller (Noussipiel og Hanawalt 2002), men hvis skadenivået er for høyt vil dette medføre pre- og postimplantasjonstap.

Implantasjonstap etter paternell eksponering kan skyldes flere typer skader. En årsak kan være cytogenetiske defekter som er observert i paternell forkjerne etter AA-eksponering (Marchetti, Lowe et al. 1996). Det er kjent at kromatin-addukter i sperm kan bli omdannet til cytogenetiske forstyrrelser når de utsettes for DNA-reparasjon i occyten (Marchetti, Lowe et al. 1996). Dette kan ha sammenheng med at moden sperm selv har nesten ingen DNA-reparasjonsevne, som kan medføre molekulæreskader i hannlig forkjerne i en zygote, disse kan føre til kromosombrudd og omdanning av kromosomer.

Oppsummert viser våre studier av embryoutvikling at preimplantasjonsembryoer er nyttige for å forstå mekanismer for paternelt mediert reproduksjonstoksisitet. AA-eksponering hos hannen viste seg å påvirke celledelingsraten hos det utviklende embryoet. Både fortidlig og forsinket passasje gjennom embryoets første celledelinger ble observert. Det kan tenkes at høyere skadenivåer i sperm fører til forsinket celledeling grunnet reparasjon eller utviklingsarrest, mens lavere skadenivåer fører til en raskere dekondensering av spermkromatin og dermed raskere utvikling gjennom den første celledelingen.

4.5 DNA-skaderesponsproteiner i embryoer fertilisert med akrylamid-eksponert sperm

I denne delen av oppgaven ble uttrykket av tumorsuppressorproteinet p53 og den fosforylerte formen av histon-proteinet H2AX (γ H2AX) undersøkt. Tidlige embryostadier synes å mangle stressresponser som G1/S, G2/M sjekkpunkter og apoptose, men har et p53-avhengig S-fase sjekkpunkt (Adiga, Toyoshima et al. 2007).

Embryoer ble immunfarget en eller to dager etter fertilisering med antistoff mot γ H2AX og p53. Den lave fertiliseringsraten som ble oppnådd gjorde at det ble for få embryoer tilgjengelige for immunfarging, slik at fargemønsteret ikke kunne karakteriseres tilfredsstillende. Tendensen var imidlertid at det ble observert mer induksjon av fosforylert H2AX i embryoer fra eksponert far. Det ble også observert induksjon av proteinet p53 i eksponerte embryoer sammenlignet med kontrollembrøer, men dette er prelimære resultater.

γ H2AX-foci ble observert både i kontroll og i eksponerte embryoer, men i varierende grad. γ H2AX regnes som en markør for dobbeltrådbrudd, samtidig som mange celletyper (uten eksponering) viser fosforylering av H2AX i S og G2/M-fasen av cellesyklus. Ettersom tidlige

embryoer etter første celledeling har en rask gjennomgang av celledyklus vil det være en høy andel av celler i S og G2/M i våre forsøk. Hvordan γ H2AX uttrykkes i normale, delende 2-4-cellers embryoer er ikke rapportert. I våre forsøk ble det observert γ H2AX-foci i kontrollembryoer ved 2- og 4-cellestadiet. Sammenlignet med kontrollembryoer syntes eksponerte embryoer å ha kraftigere γ H2AX-farging i kjernen. Dette indikerer at AA induserer dobbelttråddbrudd i embryoer fra eksponert far. Det er foreslått at DNA-skade i sperm kan gi opphav til dobbelttråddbrudd i zygoten. Blant annet har forsøk med mus med nedsatt evne til å reparere dobbelttråddbrudd vist at fertilisering med sperm utsatt for ioniserende stråling gir dobbelttråddbrudd i embryoer og økning i kromosomale forandringer (Marchetti, Essers et al. 2007).

Induksjon av p53 og γ H2AX er tegn på stressresponser i embryoer befruktet med AA-eksponert spermcelle. H2AX fungerer i opprettholdelse av genomisk stabilitet (Celeste, Petersen et al. 2002; Franco, Gostissa et al. 2006), mens normal fungerende p53-protein regulerer blant annet celledyklusarrest og induksjon av apoptose (Fridman og Lowe 2003). Om et embryo skal kunne utvikle seg normalt vil avhenge om det er mulig å reparere DNA-skaden. Ulempen med høyt nivå av DNA-skade fra spermceller er at de kan bidra til at en stor andel befruktete oocytter ikke vil overleve embryonal utvikling, og dermed vil resultatet bli en høy andel tidlig spontanaborter (Ahmadi og Ng 1999b). Induksjon av begge disse stressproteinene kan være tegn på begynnende apoptose i embryoene. Det er vist at initiering av DNA-fragmentering under apoptose induserer fosforylering av H2AX (Rogakou, Nieves-Neiras et al. 2000). I oppgaven observerte vi at de fleste embryoer fra eksponert far utviklet seg videre til minst 4-cellestadiet. Det er kjent at apoptose induseres i seinere delinger av pattedyrembryoer eller i blastocyststadier (oversiktsartikkel av Hardy 1999; Brison 2000), og ikke i løpet av de første celledelingene. Apoptose-induksjon i løpet av de første celledelingene vil svekke overlevelsessjansene til embryoet. Det er ikke sett på videre utvikling av embryoer i denne oppgaven, men senere resultater indikerer at en del av embryoene utvikler seg unormalt (færre celler i blastocysten).

5. KONKLUSJON

1. Samlet har denne oppgaven bidratt til å optimalisere kometmetoden for musespermceller. Oppgaven viser at både komet og SCSA er metoder som kan måle AA-induserte skader i sperm.
2. I overensstemmelse med studier av dominant letalitet observeres høyest nivå av spermskade 7 dager etter AA-eksponering. Dette viser at det er tidlige spermatozoer og seine spermatider som er mest sårbare for AA-induserte skader.
3. Det ble brukt sperm-kometmetode med Fpg for å detektere baseskader som gjenkjennes av dette enzymet inkludert mulige oksidative skader. Analysene viste ingen signifikante DNA-skader 24 timer etter *in vivo*-eksponering. Imidlertid var det en signifikant økning av skadenivå i spermceller eksponert *in vitro* 1 time med 5 mM GA, ved bruk av Fpg. Det er ikke enkelt å vite utfra våre forsøk om DNA-skader som vi måler i sperm-kometmetoden med Fpg er oksidative DNA-lesjoner.
4. I oppgaven etablerte vi *in vitro* fertilisering ved MIKT. Observasjoner fra embryo forsøk gir indikasjon på at sperm isolert fra dyr eksponert *in vivo* 7 dager etter eksponering har endret egenskaper med hensyn til celledelingsrate hos fertiliserte embryoer. Imidlertid observerer vi ingen forskjeller mellom befruktningsrate fra eksponert sperm, sammenlignet med kontroll.
5. Foreløpige resultater fra immunfarginger viser at sentrale stressresponsproteiner (her p53 og H2AX) induseres i embryoer befruktet med eksponerte spermceller sammenlignet med kontroller. For validering av disse resultatene fra embryoutvikling og immunfarging bør det kjøres flere slike forsøk.

6. REFERANSER

- Adiga, S., Toyoshima, M., Shiraishi, K., Shimura, T., Takeda, J., Taga M., Nagai, H., Kumar, P., Niwa, O. (2007). "p21 provides stage specific DNA damage control to preimplantation embryos." Oncogene **26**: 6141-6149.
- Adler, I.-D., Baumgartner, A., Gonda, H., Friedman M. A., Skerhut, M. (2000). "1-Aminobenzotriazole inhibits acrylamide-induced dominant lethal effects in spermatids of male mice " Mutagenesis **15.No.2**: 133-136.
- Agarwal, A., and Said, Tamer M. (2003). "Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility." Human reproduction **9 No.4**: 331-345.
- Ahmadi, A., and Ng, Soon-Chey. (1999a). "Developmental capacity of damaged spermatozoa " Human reproduction **14 No.9**: 2279-2285.
- Ahmadi, A., and Ng, Soon-Chey. (1999b). "Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa." Journal of experimental zoology **284**: 696-704.
- Aquilina, G., Crescenzi, M., Bignami, M. (1999). "Mismatch repair, G(2)/M cell cycle arrest and lethality after DNA damage." Carcinogenesis **20**: 2317-2326.
- Armstrong, J. F., Kaufman, M. H., Harrison, D. J. Clarke, A. R. (1995). "High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice." Current biology **5 No.8**: 931-935.
- Awwad, J.T., Sayegh, R.A., Tao, X. J., Hassan, T., Awwad, S. T., Isaacson, K. (1999). "The SCID mouse: an experimental model for endometriosis." Human reproduction **14 No. 12**: 3107-3111.
- Balhorn, R. (1982). "A model for the structure of chromatin in mammalian sperm." The journal of cell biology **93**: 289-305.
- Baum, M., Loeppky, R. N., Thielen, S., Eisenbrand, G. (2008). "Genotoxicity of glycidamide in comparison to 3-N-Nitroso-oxazolidin-2-one." Journal of agricultural and food chemistry **56**: 5989-5993.
- Becalski, A., Lau, B. P.-Y., Lewis, D., Seaman, S. W. (2003). "Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling." Journal of argicultural and food chemistry **51**: 802-808.
- Bergmark, E. (1997). "Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers, and nonsmokers." Chemical research toxicology **10**: 78-84.
- Bergmark, E., Calleman, C. J., He, F. S., Costa L. G. (1993). " Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide" Toxicology and applied pharmacology **129** (1): 45-54.
- Besaratinia, A., and Pfeifer, G. P. (2004). "Genotoxixity of acrylamide and glycidamide." Journal of the National Cancer Institute **96 No.13**: 1023-1029.
- Besaratinia, A., and Pfeifer, G. P. (2007). "A review of mechanisms of acrylamide carcinogenesis." Carcinogenesis **28 No.3**: 519-528.
- Bjellaas, T., Janák, K., Lundanes, E., Kronberg, L., Becher, G. (2005). "Detemination and quantification of urinary metabolites after dietary exposure to acrylamide." Xenobiotica **35** (10,11): 1003-1018.

- Bjålie, J. G., Haug, E., Sand, O., Sjaastad Ø. V., Toverud, K. C (2000). Menneskekroppen, fysiologi og anatomi, Gyldendal Norsk Forlag AS.
- Blasiak, J., Gloc, E., Wozniak, K., Czechowska, A. (2004). "Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes." Chemico-Biological Interactions **149**(137-149).
- Brancolini, C., Lazarevic, D., Rodriguez, J., Schneider, C. (1997). "Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of β -catenin." The journal of cell biology **139** No.3(November 3): 759-771.
- Braude, P., Bolton, V., Moore, S. (1988). "Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development." Nature **332**: 459-461.
- Brinkworth, M. H. (2000). "Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans." Int. J. Androl **23**: 123-135.
- Brison, D. R. (2000). "Apoptosis in mammalian preimplantation embryos: regulation by survival factors." Human Fertility (Camb.) **3**: 36-47.
- Brown, T. A. (2002). Genomes, © BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Brunborg, G., Duale, N., Haaland, J. T., Bjørge, C., Söderlund, E., Dybing, E., Wiger, R., Olsen, A-K. (2007). DNA repair capacities in testicular cells of rodents and man. Male-mediated developmental toxicity. D. Anderson and M. H. Brinkworth. Bradford, UK, RSCPublishing: 273-285.
- Calleman, C. J. (1996). "The metabolism and pharmacokinetics of acrylamide: Implications for mechanisms of toxicity and human risk estimation." Drug Metab. Rev. **28**: 527-590.
- Campbell, N. A., and Reece, J. B. (2002). Biology. San Francisco,Boston,New York,Cape town,HongKong,London,Madrid,Mexicocity,Montreal,Munich,Paris,Singapore,Sydney,Tokyo,Toronto, Pearson Education.
- Carere, A. (2006). "Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review." Ann ist super sanita **42**: 144-155.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M. J., Redon, C., Pilch, D. R., Oлару, A., Eckhaus, M., Camerini-Otero, R. D., Tessarollo, L., Livak, F., Manova, K., Bonner, W. M., Nussenzweig, M. C. Nussenzweig, A. (2002). "Genomic instability in mice lacking histone H2AX." Science **296**(May 3): 922-927.
- Collins, A., Cadet, J., et al. (1997). "Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA Oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January, 1997." Carcinogenesis **18** No.9: 1833-1836.
- Collins, A. R., Cadet, J., Möller, L., Poulsen, H. E., Viña, J. (2004). "Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells?" Biochemistry and biophysics **423**: 57-65.
- Collins, A. R., Dobson, V. L., Dušinská, M., Kennedy, G., Štětina, R. (1997). "The comet assay: what can it really tell us?" Mutation research **375**: 183-193.
- Cooke, H. J., and Saunders, P. T. K. (2002). "Mouse models of male infertility." Nature reviews genetics(October 2002): 790-800.

- Cosentino, M. J., and Cockett, A. T. K. (1986). "Review article: Structure and function of the epididymis." Urological research **14**: 229-240.
- Costa, G. G. d., Churchwell, M. I., Hamilton, L. P., Tungeln, L. S. V., Beland, F. A., Marques, M. M., Doerge, D. R. (2003). "DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice " Chemical research toxicology **16 No.10**: 1328-1337.
- Crow, J. F. (1997). "The high spontaneous mutation rate: Is it a health risk?" Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 8380-8386.
- Dearfield, K. L., Douglas, G. R., Ehling, U. H., Moore, M. M., Sega, G. A., Brusick, D. J. (1995). "Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk." Mutation research **330**: 71-99.
- Delhanty, J. D. A., and Handyside, A. H. (1995). "The origin of genetic defects in the human and their detection in the preimplantation embryo." Human Reproduction Update **1**: 201-215.
- Depa-Martynow, M., Jedrzejczak, P., Pawalczyk, L. (2007). "Pronuclear scoring as a predictor of embryo quality in *in vitro* fertilization program." Folia histochemica et cytobiologica **45 Supp. 1**: 87-91.
- Derijck, A. A. H. A., Heijden, G. W. v. d., Giele, M., Philippens, M. E. P., Bavel, C. C. A. W. v., Boer, P. d. (2006). " γ H2AX signalling during sperm chromatin remodelling in the mouse zygote." DNA repair **5**: 959-971.
- Doerge, D. R., Costa, G. G. d., McDaniel, L. P., Churchwell, M. I., Twaddle, N. C., Beland, F. A. (2005). "DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats." Mutation research **580**: 131-141.
- Doerge, D. R., Young, J. F., McDaniel, L. P., Twaddel, N. C., Churchwell, M. I. (2005). "Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 334 rats." Toxicology and applied pharmacology **208**: 199-209.
- Doerge, D. R., Young, J. F., McDaniel, L. P., Twaddel, N. C., Churchwell, M. I. (2005). "Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in B6C3F₁ mice." Toxicology and applied pharmacology **202**: 258-267.
- Donnelly, E. T., McClure, N., Lewis, S. E. (1999) "The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation *in vitro* on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa." Mutagenesis **14**: 505-512.
- Duez, P., Dehon, G., Kumps, A., Dubois, J. (2003). "Statistics of the comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects." Mutagenesis **18 No.2**: 159-166.
- Dybing, E., and Sanner, T. (2003). "Forum Risk assessment of acrylamide in foods." Toxicological sciences **75**: 7-15.
- European Commission Scientific Committee on Food. "Opinion of the Scientific Committee on food on new findings regarding the presence of acrylamide in food" (expressed on 3 July 2002).
- Evenson, D., and Jost, L. (2000). "Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment." Methods in cell science **22**: 169-189.

- Evenson, D. P., Jost, L. K., Baer, R. K. (1993). "Effects of methyl methanesulfonate on mouse sperm chromatin structure and testicular cell kinetics." Environmental and molecular mutagenesis **21**: 144-153.
- Evenson, D. P., and Wixon, R. (2005). "Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)." Toxicology and applied pharmacology **207**: S532-S537.
- Fawcett, D. W. (1975). "The mammalian spermatozoon." Developmental biology **44**: 394-436.
- Fedorcsák, P., and Storeng, R. (2003). "Effects of leptin and leukemia inhibitory factor on preimplantation development and STAT3 signaling of mouse embryos In vitro." Biology of reproduction **69**: 1531-1538.
- Fennell, T. R., Summer, S. C. J., Snyder, R. W., Burgess, J., Spicer, R., Bridson, W. E, Friedman, M. A. (2005). "Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans." Toxicological sciences **85**: 447-459.
- Fennell, T. R., Sumner, S. C. J., Snyder, R. W., Burgess, J., Friedman, M. A. (2006). "Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans." Toxicological sciences **93**(2): 256-267.
- Flach, G., Johnson, M. H., Braude, P. R., Taylor, R. A. S., Bolton, V. N. (1982). "The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo." The EMBO Journal **1 No.6**: 681-686.
- Franco, S., Gostissa, M., Zha, S., Lombard, D. B., Murphy, M. M., Zarrin, A. A., Yan, C., Tepsuporn, S., Morales, J. C., Adams, M. M., Lou, Z., Bassing, C. H., Manis, J. P., Chen, J., Carpenter, P. B., Alt, F. W. (2006). "H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocations." Molecular cell **21**(January 20): 201-214.
- Fridman, J. S., and Lowe, S. W. (2003). "Control of apoptosis by p53." Oncogene **22**: 9030-9040.
- Friedberg, E. C., and Meira, L. B. (2006). "Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7." DNA repair **5**: 189-209.
- Friedman, M. (2003). "Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review." Journal of agricultural and food chemistry **51**: 4504-4526.
- Friedman, M. A., Zeiger, E., Marroni, D. E., Sickles, W. D. (2008). "Inhibition of rat testicular nuclear kinesins (*Krp2*; KIFC5A) by acrylamide as a basis for establishing a genotoxicity threshold." Journal of agricultural and food chemistry **56**: 6024-6030.
- Fuhr, U., Boettcher, M. I., Kinzig-Schippers, M., Weyer, A., Jetter, A., Lazar, A., Taubert, D., Tomalik-Scharte, D., Pournara, P., Jakob, V., Harlfinger, S., Klaassen, T., Berkessel, A., Angerer, J., Sörgel, F., Schömig, E. (2006). "Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity." Cancer epidemiology biomarkers & prevention **15**(2): 266-271.
- Ghanayem, B. I., Witt, K. L., El-Hadri, L., Hoffler, U., Kissling, G. E., Shelby, M. D., Bishop, J. B. (2005). "Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: evidence supporting a glycidamide-mediated effect" Biology of reproduction **72**: 157-163.

- Generoso, W. M., Sega, G. A., Lockhart, A. M., Hughes, L. A., Cain, K. T., Cacheiro, N. L. A., Shelby, M. D. (1996). "Dominant lethal mutations, heritable translocations, and unscheduled DNA synthesis induced in male mouse germ cells by glycidamide, a metabolite of acrylamide." Mutation research **371**: 175-183.
- Goffeng, L. O., Kjuus, H., Heier, M. S., Skaug, V., Sjöholm, H., Sørensen, K. A., Ulvestad, B. (2002). Nevropsykologiske, nevrofysiologiske og visuelle effekter blant arbeidstakere tidligere eksponert for akrylamid og N-metylol-akrylamidholdige tetningsstoffer under tunnelarbeid, Statens arbeidsmiljøinstitutt, Oslo. **3,6**.
- Grollman, A. P., and Moriya, M. (1993). "Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within." Trends genet **9**: 246-249.
- Haines, G., Marples, B., Daniel, P., Morris, I. (1998). DNA damage in human and mouse spermatozoa after In vitro-irradiation assessed by the comet assay. Reproductive toxicology. New York, Plenum Press.
- Hales, B. F., Aguilar-Mahecha, A., Robaire, B. (2005). "The stress response in gametes and embryos after paternal chemical exposure." Toxicology and applied pharmacology **207**: 514-520.
- Hardy, K. (1999). "Apoptosis in the human embryo." Reviews of Reproduction **4**: 125-134.
- Harrison, R. H., Kuo, H.-C., Scriven, P. N., Handyside, A. H., Ogilvie, C. M. (2000). "Lack of cell cycle checkpoints in human cleavage stage embryos revealed by a clonal pattern of chromosomal mosaicism analysed by sequential multicolour FISH." Zygote **8**: 217-224.
- Harrouk, W., Robaire, B., Hales, B. F. (2000). "Paternal exposure to cyclophosphamide alters cell-cell contacts and activation of embryonic transcription in the pre-implantation rat embryo." Biology and reproduction **63**: 74-81.
- Hasty, P., Campisi, J., Hoeijmakers, J., Steeg, H. V., Vijg, J. (2003). "Aging and genome maintenance: Lessons from the mouse?" Science **299** (February 2003): 1355-1359.
- Holland, N., Ahlborn, T., Turteltaub, K., Markee, C., Moore, D., Wyrobek, A. J., Smith, M. T. (1999). "Acrylamide causes preimplantation abnormalities in embryos and induces chromatin-adducts in male germ cells of mice." Reproductive toxicology **13**: 167-178.
- Holstein, A.-F., Schulze, W., Davidoff, M. (2003). "Review: Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment." Reproductive biology and endocrinology **1 No.107**.
- Hughes, C. M., Lewis, S. E. M., McKelvey-Martin, V., Thompson, W. (1997). "Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline singel cell gel electrophoresis assay." Mutation research **374**: 261-268.
- Hunt, P., LeMaire, R., Embury, P., Sheean, L., Mroz, K. (1995). "Analysis of chromosome behaviour in intact mammalian oocytes: monitoring the segregation of a univalent chromosome during female meiosis." Human Molecular Genetics **4 No.11**: 2007-2012.
- Irvine, D. S., Twigg, J. P., Gordon, E. L., Fulton, N., Milne, P. A., Aitken, R. J. (2000). "DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality." Journal of andrology **21 No.1**: 33-44.
- Ismail, I. H., and Hendzel, M. J. (2007). "Review article: The γ -H2A.X: Is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more?" Environmental and molecular mutagenesis **49**: 73-82.

- Jansen, J., Olsen, A. K., Wiger, R., Naegeli, H., Boer P. d., Hoeven, F. v. d., Holme, J. A., Brunborg, G., Mullenders, L. (2001). "Nucleotide excision repair in rat male germ cells: low level of repair in intact cells contrasts with high dual incision activity in vitro." Nucleic acids research **29 No.8**: 1791-1800.
- Jaroudi, S., and SenGupta, S. (2007). "DNA repair in mammalian embryos." Mutation research **635**: 53-77.
- Jiang, L., Cao, J., An, Y., Geng, C., Qu, S., Jiang, L., Zhong, L. (2007). "Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells." Toxicology in vitro **21 No.8**: 1486-1492.
- Johansson, F., Lundell, T., Rudberg, P., Erixon, K., Jenssen, D. (2005). "Mutagenicity and DNA repair of glycidamide-induced adducts in mammalian cells." Mutation research **580**: 81-89.
- Johansson, L., and Solvoll, K. (1997). Norkost 1997 Landsomfattende kostholdundersøkelse blant menn og kvinner i alderen 16-79 år. Statens råd for ernæring og fysisk aktivitet, Oslo 1999. **Rapport nr.2/1999**: 1-84.
- Jørgensen, N., Andersen, A-G., Eustache, F., Irvine, D. S., Suominen, J., Petersen, J. H., Andersen, A. N., Auger, J., Cawood, E. H. H., Horte, A., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., Vierula, M., Toppari, J., Skakkebæk, N. E. (2001) "Regional differences in semen quality in Europe." Human Reproduction **16 No.5**: 1012-1019.
- Kadry, A. M., Friedman, M. A., Abdel-Rahman, M. S. (1999). "Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rats." Environmental toxicology and pharmacology **7**: 127-133.
- Keyes, T. K. (1997). "Analysis of Levene's test under design imbalance." Journal of educational and behavioral statistics **22 No.2**: 227-236.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnström, G. (1996). "The comet assay: mechanism and technical considerations." Mutation research **363**: 89-96.
- Koskinen, M., and Plná, K. (2000). "Mini-Review Specific DNA adducts induced by some mono-substituted epoxides in vitro and in vivo " Chemico-Biological interactions **129(3)**: 209-229.
- Lercher, M. J., Williams, E. J. B., Hurst, L. D. (2001). "Local similarity in evolutionary rates extends over whole chromosomes in human-rodent and mouse-rat comparisons: implications for understanding the mechanistic basis of the male mutation bias." Mol.Biol. Evol. **18 (11)**: 2032-2039.
- Lewis, S. E. M., and Agbaje, I. M. (2008). "Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes." Mutagenesis: 1-8.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. (2004). "The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination." DNA repair **3**: 817-826.
- Lin-Lee, Y.-C., Pham, L. V., Tamayo, A. T., Fu, L., Zhou H. J., Yoshimura, L. C., Decker, G. L., Ford, R. J. (2006). "Nuclear localization in the biology of the CD40 receptor in normal and Neoplastic human B lymphocytes." The journal of biological chemistry **281 No.27**: 18878-18887.
- Loeb, L. A., and Preston, B. D. (1986). "Mutagenesis by aprinic/aprimidinic sites." Annual reviews **20**: 201-230.

- Loon, A. A. W. M. V., Boer, P. J. D., Schans, G. P. V. D., Mackenbach, P., Grootegeed, J. A., Baan, R. A., Lohman P. H. M. (1991). "Immunochemical detection of DNA damage induction and repair at different cellular stages of spermatogenesis of the hamster after in vitro or in vivo exposure to ionizing radiation." Experimental cell research **193**: 303-309.
- Loon, A. A. W. M. V., Sonneveld, E., Hoogerbrugge, J., Schans, G. P. V. D., Lohman, P. H. M., Baan, R. A. et al. (1993). "Induction and repair of DNA single-strand breaks and DNA base damage at different cellular stages of spermatogenesis of the hamster upon in vitro exposure to ionizing radiation " Mutation research **294**: 139-148.
- Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J-G., Casper, R. F. (1998). "Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa." Human reproduction **13 No.4**: 896-900.
- Lovell, D. P., and Omori, T. (2008). "Statistical issues in the use of the comet assay." Mutagenesis **23**: 171-182.
- Maniere, I., Godard, T., Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Guffroy, M., Laurentie, M., Poul, J-M. (2005). "DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide." Mutation research **580**: 119-129.
- Marchesi, V. T., and Andrews, E. P. (1971). "Glycoproteins: Isolation from cell membranes with lithium diiodosalicylate." Science **17**: 1247-1248.
- Marchetti, F., Essers, J., Kanaar, R., Wyrobek, A. J. (2007). "Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations." PNAS **104 No. 45** (November 6, 2007): 17725-17729.
- Marchetti, F., Lowe, X., Bishop, J., Wyrobek, A. J. (1997). "Induction of chromosomal aberrations in mouse zygotes by acrylamide treatment of male germ cells and their correlation with dominant lethality and heritable translocations." Environmental and molecular mutagenesis **30**: 410-417.
- Marchetti, F., Lowe, X., Moore II D., Bishop, J., Wyrobek, A. (1996). "Paternaly transmitted chromosome structural aberrations detected in mouse first-cleavage zygote metaphases by multicolor FISH painting." Chromosome research **8**: 604-613.
- Marchetti, F., and Wyrobek, A. J. (2008). "DNA repair decline during mouse spermiogenesis results in the accumulation of heritable DNA damage." DNA repair **7**: 572-581.
- Marlowe, C., Clark, M. J., Mast, R. W., Friedman, M. A., Waddell, W. J. (1986). "The distribution of [14C]acrylamide in male and pregnant Swiss-Webster mice studied by whole-body autoradiography." Toxicology and applied pharmacology **86** (3): 457-465.
- Mei, N., Hu, J., Churchwell, M. I., Guo, L., Moore, M. M., Doerge, D. R., Chen, T. (2008). "Genotoxic effects of acrylamide and glycidamide in mouse lymphoma cells." Food and chemical toxicology **46**: 628-636.
- Meistrich, M. L., Hughes, T. J., Bruce, W. R. (1975). "Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone." Nature **258**: 145.
- Meistrich, M. L., Reid, B. O., Barcellona, W. J. (1975). "Meiotic DNA synthesis during mouse spermatogenesis " The journal of cell biology **64**: 211-222.
- Mirkes, P. E. (2002). "2001 Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development." Teratology **65**: 228-239.

- Mol, C. D., Parikh, S. S., Putnam, C. D., Lo, T. P., Tainer, J. A. (1999). "DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases " Annual review of biophysics and biomolecular structure **28**: 101-128.
- Moore, D. S., and McCabe, G. P. (2003). Introduction to the practice of statistics, fourth edition W.H Freeman and Company.
- Morris, I.D., Ilott, S., Dixon, L., Brison, D. R. (2002). "The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by singel cell electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development." Human reproduction **17 No.4**: 990-998.
- Mukaida, T., Wada, S., Takahashi, K., Pedro, P. B., An, T. Z., Kasai, M. (1998). "Vitrification of human embryos on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos." Human reproduction **13 No.10**: 2874-2879.
- Munne, S., Dailey, T., Sultan, K. M., Grifo, J., Cohen, J. (1995). "The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy." Molecular human reproduction **1**: 94-100.
- Musil, L. S., Carr, C., Cohen, J. B., Merlie, J. P. (1988). "Acetylcholine receptor-associated 43K protein contains covalently bound myristate." The journal of cell biology **107**: 1113-1121.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., Behringer, R. (2003). Manipulating the mouse embryo, A laboratory manual, third edition. New York, John Inglis, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Naish, S. J., Perreault, S. D., Foehner, A. L., Zirkin B. R. (1987). "DNA synthesis in the fertilizing hamster sperm nucleus: Sperm template availability and egg cytoplasmic control." Biology of reproduction **36**: 245-253.
- Naz, R. K., Ahmad, K., Kumar, R. (1991). "Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function." Journal of cell science **99**: 157-165.
- Ni, Z.-Y., Liu, Y.-Q., Shen H.-M., Chia, S. E., Ong, C. N. (1997). "Does the increase of 8-hydroxydeoxyguanosine lead to poor sperm quality?" Mutation research **381**: 77-82.
- Nouspikel, T., and Hanawalt, P. C. (2002). "DNA repair in terminally differentiated cells." DNA repair **1**: 59-75.
- Olive, P. L., and Banáth, J. P. (2006). "The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells." Nature protocols **1**: 23-29.
- Olive, V., and Cuzin, F. (2005). "The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenis technology." The international journal of biochemistry & cell biology **37**: 246-250.
- Olsen, A.-K., Bjørtuft, H., Wiger, R., Holme, J. A., Seeberg, E. C., Bjørås, M., Brunborg, G. (2001). "Highly efficient base excision repair (BER) in human and rat male germ cells." Nucleic Acids Research **29**: 1781-1790.
- Olsen, A.-K., Duale, N., Bjørås, M., Larsen, C. T., Wiger, R., Holme, J. A., Seeberg, E. C., Brunborg, G. (2003). "Limited repair of 8-hydroxy-7,8-dihydroguanine residues in human testicular cells." Nucleic acids research **31 No.4**: 1351-1363.
- Olsen, A.-K., Lindeman, B., Wiger, R., Duale, N., Brunborg, G. (2005). "Review: How do male germ cells handle DNA damage?" Toxicology and applied pharmacology **207(2)**: 521-531.

- Paul, C., Melton, D. W., Saunders, P. T. K. (2008). "Do heat stress and deficits in DNA repair pathways have a negative impact on male fertility?" MHR-Basic science of reproductive medicine **14 No.1**: 1-8.
- Petrini, J. H. J., and Stracker, T. H. (2003). "The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators." Trends in cell biology **13 No.9**: 458-462.
- Pflaum, M., Kielbassa, C., Garmyn, M., Epe, B. (1998). "Oxidative DNA damage induced by visible light in mammalian cells: extent, inhibition by antioxidants and genotoxic effects." Mutation research **408**: 137-146.
- Pham, L. V., Tamayo, A. T., Yoshimura, L. C., Lo, P., Ford, R. J. (2003). "Inhibition of constitutive NF- κ B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to cell cycle arrest and apoptosis." The journal of immunology **171**: 88-95.
- Pogany, G. C., Corzett, M., Weston, S., Balhorn, R. (1981). "DNA and protein content of mouse sperm, implications regarding sperm chromatin structure." Experimental cell research **136**: 127-136.
- Puppel, N., Tjaden, Z., Fueller, F., Marko, D., Generoso, W. M. (2005). "DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells." Mutation Research **580**: 71-80.
- Raff, M. C. (1992). "Social controls on cell survival and cell death." Nature **356 No.2**: 397-399.
- Ramos, L., and Wetzels, A. M. M. (2001). "Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay " Human reproduction **16 No.8**: 1703-1707.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., Bonner, W. M. (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks In vivo." The journal of cell biology **146 No.5** (September 6): 905-915.
- Rogakou, E. P., Nieves-Neiras, W., Boon, C., Pommier, Y., Bonner, W. M. (2000). "Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at Serine 139." The journal of biological chemistry **275**(March 31): 9390-9395.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., Bonner, W. M. (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on Serine 139*." The journal of biological chemistry **273 No. 10**(March 6): 5858-5868.
- Roos, W. P., and Kaina, B. (2006). "DNA damage-induced cell death by apoptosis." Trends in molecular medicine **12 No.9**: 440-450.
- Royston, P. (1992). "Approximating the Shapiro-Wilk W-test for non-normality." Statistics and computing **2**: 117-119.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Sinha-Hikim, A. P., Clegg, E. D. (1990). Histological and histopathological evaluation of the Testis.
- Rydberg, B., and Johanson, K. J. (1978). DNA repair mechanism. P. C. Hanawalt and E. C. Friedberg. New York, Academic Press: 465-468.
- Sakamoto, J., and Hashimoto, K. (1986). "Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice - effects on fertility and sperm morphology." Archives of toxicology **59**: 201-205.

- Sanocka, D., and Kurpisz, M. (2004). "Reproductive biology and endocrinology." Reproductive biology and endocrinology **2**(12).
- Schmid, P., Lorenz, A., Hameister, H., Montenarh, M. (1991). "Expression of p53 during mouse embryogenesis." Development **113**(3): 857-865.
- Schultz, G. A. (1986). "Molecular biology of the early mouse embryo " Biol. Bull **171**: 291-309.
- Sega, G. A. (1979). "Unscheduled DNA synthesis (DNA repair) in the germ cells of male mice-Its role in the study of mammalian mutagenesis." Genetics **92**: 49-58.
- Sega, G. A., Alcota, R. P. V., Tancongco, C. P., Brimer, P. A. (1989). "Acrylamide binding to the DNA and protamine of spermiogenic stages in the mouse and its relationship to genetic damage." Mutation research **216**: 221-230.
- Segerbäck, D., Calleman, C. J., Schroeder, J. L., Costa, L. G., Faustman, E. M. (1995). "Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [¹⁴C]acrylamide." Carcinogenesis **16**(5): 1161-1165.
- Shaman, J. A., and Ward, W. S. (2006). Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. Cambridge, New York, Melbourne, Madride, Singapore, São Paulo, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS.
- Sickles, D. W., Sperry, A. O., Testino, A., Friedman, M. (2007). "Acrylamide effects on kinesin-related proteins of the mitotic/meiotic spindle." Toxicology and applied pharmacology **222**: 111-121.
- Simple Interactive Statistical Analysis (SISA). "Bonferroni Correction Online" Tilgjengelig på <http://www.quantitativeskills.com/sisa/calculations/bonfer.htm>. 2008
- Singh, N. P., Danner, D. B., Tice, R. R., McCoy, M. T., Collins, G. D., Schneider, E. L. (1989). "Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm." Experimental cell research **184**: 461-470.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." Experimental cell research **175**: 184-191.
- Spector, A. A., John, K., Fletcher, J. E. (1969). "Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin." Journal of lipid research **10**: 56-67.
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M. C., Riediker, S. (2002). "Acrylamide from Maillard reaction products." Nature **419**(6906): 449-50.
- Suganuma, R., Yanagimachi, R., Meistrich, M. L. (2005). "Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI." Human reproduction: 1-8.
- Sumner, S. C. J., Fennell, T. R., Moore, T. A., Chanas, B., Gonzale, F., Ghanayem, B. I. (1999). "Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice." Chemical research toxicology **12**: 1110-1116.
- Sumner, S. C. J., MacNeela, J. P., Fennell, T. R. (1992) "Characterization and quantitation of urinary metabolites of {1,2,3-¹³C}acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy." Res Toxicol **5**: 81-89.

- Sutovsky, P., and Manandhar, G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo, Cambridge university Press.
- Svensson, K., Abramsson, L., Becker, W., Glynn, A., Hellenas, K-E., Lind, Y., Rosen, J. (2003). "Dietary intake of acrylamide in Sweden." Food and chemical toxicology **41 No.11**: 1581-1586.
- Swedish National Food Agency, Press conference, Uppsala (2008). "Akrylamid Sammanfattning". Tilgjengelig på http://www.slv.se/templates/SLV_Page.aspx?id=11547&epslanguage=SV.
- Szczygiel, M. A., and Ward, W. S. (2002). "Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage." Biology of reproduction **67**: 1532-1537.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M. (2002). "Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs." Journal of agricultural and food chemistry **50**: 4998-5006.
- Thielen, S., Baum, M., Hoffmann, M., Loeppsky, R. N., Eisenbrand, G. (2006). "Genotoxicity of glycidamide in comparison to (±)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and -acetoxo-N-nitroso-diethanolamine in human blood and in mammalian V79-cells." Molecular nutrition & food research **50**(4-5): 430-436.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J-C., Sasaki, Y. F. (2000). "Singel cell gel/comet assay: Guidelines for In vitro and In vivo genetic toxicology testing." Mutagenesis **35**: 206-221.
- Titenko-Holland, N., Ahlborn, T., Lowe, X., Shang, N., Smith, M. T., Wyrobek, A. J. (1998). "Micronuclei and developmental abnormalities in 4-Day mouse embryos after paternal treatment with acrylamide." Environmental and molecular mutagenesis **31**: 206-217.
- Trasler, J. M., Hermo, L., Robaire, B. (1988). "Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: A quantitative approach." Biology of reproduction **38**: 463-479.
- Turner, T. T. (1995). "On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate." Journal of andrology **16 No.4**: 292-298.
- Twaddle, N. C., McDaniel, L. P., Costa, G. G. D. (2004). "Determination of acrylamide and glycidamide serum toxicokinetics in B6C3F₁ mice using LC-ES/MS/MS." Cancer letters **207**: 9-17.
- Twigg, J.P., Irvine, D.S., Aitken, R. J. (1998). "Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection." Human reproduction **13 No.7**: 1864-1871.
- Tyl, R. W., and Friedman, M. A. (2003). "Effects of acrylamide on rodent reproductive performance." Reproductive toxicology **17**: 1-13.
- Tyl, R. W., Marr, M. C., Myers, C. B., Ross, W. P., Friedman, M. A. (2000). "Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats." Reproductive toxicology **14**: 147-157.
- Vattem, D. A., and Shetty, K. (2003). "Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction." Innovative food science and emerging technologies **4**: 331-338.

- Vinson, R. K., and Hales, B. F. (2002). "DNA repair during organogenesis." Mutation Research **509**: 79-91.
- Vousden, K. H., and Lane, D. P. (2007). "p53 in health and disease." Nature reviews: molecular cell biology **8**: 275-283.
- Walter, C. A., Intano, G. W., McCarry, J. R., McMahan, C. A., Walter, R. B. (1998). "Mutation frequency declines during spermatogenesis in young mice but increases in old mice." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 10015-10019.
- Ward, W. S., and Coffey, D. S. (1991). "DNA packing and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells." Biology of reproduction **44**: 569-574.
- Wiklund, S. J., and E. Agurell (2003). "Aspects of design and statistical analysis in the comet assay." Mutagenesis **18 No.2**: 167-175.
- Wyllie, A. H. (1995). "The genetic regulation of apoptosis." Current opinion in genetics and development **5**: 97-104.
- Young, I. T. (1977). "Proof without prejudice: use of the Kolmogorov-Smirnov test for the analysis of histograms from flow systems and other sources." The journal of histochemistry and cytochemistry **25 No.7**: 935-941.
- Yusuf, A. T., Vian, L., Sabatier, R., Cano, J-P. (2000). "In vitro detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using Hep G2 cells." Mutation research **468**: 227-234.
- Zenzes, M. T., Puy, L. A., Bielecki, R., Reed, T. E. (1999). "Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa." Mol. Hum. Reprod. **5**: 125-131.
- Zharkov, D. O., Shoham, G., Grollman, A. P. (2003). "Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases." DNA repair **2**: 839-862.
- Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi, G. P., Villagran, M. D. (2003). "Acrylamide formation mechanism in heated foods " Journal of agricultural and food chemistry **51**: 4782-4787.

7. VEDLEGG

Produkter

Produkt	Produsent
Acridine Orange	Sigma-Aldrich
Agarose (lavt smeltepunkt)	Sigma-Aldrich
Akrylamid	Sigma-Aldrich
Bovint serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
citric acid monohydrate	Merck
Dako monteringsmedium	Dako Cryomation
DDT (1,4-Dithioeritol)	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Etanol (96 %)	Arcus
Fibrinogen	Calbiochem-Nova biochem corp no 341573
Fpg- ekstrakt	Laget lokalt av forsker Nur Duale (MIKT)
GelBond® film	Cambrex
Glycidamid	Toronto Research Chemicals Inc.
HCG (Human Chorionic Gonadotropin)	Sigma-Aldrich
Hepes	Sigma-Aldrich
Hoechst 33258	Calbiochem
KSOM	CHEMICON
Liquid parafin	Medicult
LIS (Lithium 3,5-diiosalicylate)	Sigma-Aldrich
M2 medium (til IVF)	Sigma-Aldrich
M2- Medium (Testikkel medium)	Sigma-Aldrich
MMS (Methyl Metansulfonat)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroksid	Merck
Natriumklorid	Merck
Parafilm	Pechinery Plastic Packaging
Paraformaldehyd	BDH Laboratories
PBS	Dulbecco
PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin)	Sigma-Aldrich og Calbiochem
P/S (Penicillin/streptomycin)	Sigma-Aldrich
Quins Advantage Protein Plus™ Fertilization (HTF) Medium	SAGE: In-Vitro Fertilization, Inc., Trumbull , CT 06611 U.S.A
Primær antistoff anti- γ H2AX, mus	Klon JWB301, www.millipore.com
Primær antistoff anti-p53, Kanin	Novocastra, NCL-p53-CM5
Sekundær antistoff anti-mus	# 715-295-150, The Jackson Laboratory
Sekundær antistoff anti-kanin	# 711-225-152, The Jackson Laboratory
SYBR®Gold	Probes.invitrogen.com
Tyrodes Acid	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trizma®base	Sigma-Aldrich
Trizma Hydroklorid, Tris-HCl	Sigma-Aldrich
TO-PRO®- 3iodide (642/661)	Probes.invitrogen.com
Trombin	Sigma-Aldrich
Tween 20	BioRad Laboratories Inc.

Løsninger og media***A. kometmetoden*****200 mM EDTA-løsning (til elektroforesebuffer)**

37,2 g EDTA løses i 500 ml dH₂O

Enzymløsning

100 mM KCl (7,46 g)

10 mM EDTA (3,72 g)

40 mM Hepes (9,32 g)

dH₂O tilsettes til 1000 ml

pH justeres til 7,6 med KOH

Glycidamid-løsning (102,2 mM)

Stamløsning: Glycidamid (87,09 g/mol). Vei inn 8,9 mg og løs i 1 ml PBS.

In vitro eksponeringsdosen var 5 mM. Dermed tilsettes det følgende volum i et eppendorfrør:

48,92 µl glycidamid stamløsning

6 µl celler

945,08 µl PBS

Nøytraliseringsbuffer

kjemikalier	2 L	5 L	Slutt-konsentrasjon
Trizma Base (121..2 g/mol)	96.96 g	242.4 g	0,4 M
dH ₂ O	Juster til pH 7.5 med kons. HCl og juster sluttvolum		

Siden nøytraliseringsbuffer kan oppbevares ved romtemperatur, kan en blande ut ønsket volum.

Lyseringsvæske (stamløsning)

Kjemikalier	445 mL	1780 mL	2670 mL	Konsentrasjon før justering
Destillert vann	350 mL	1400 mL	2100 mL	---
NaCl (58.44 g/mol)	73,05 g	292,20 g	438,30 g	2,8 M
NaOH (40.0g/mol)	4,00 g	16,00 g	24,00 g	0,224 M
Na ₂ EDTA·2H ₂ O (372.2 g/mol)	18,61 g	74,44 g	111,66 g	0,112 M
Trizma base (121.2 g/mol)	0,61 g	2,44 g	3,66 g	0,0113 M

Lyseringsløsningen kan oppbevares en tid ved romtemperatur, så en kan blande ut ønsket volum. pH justeres til 10 med NaOH/HCl

Løsning A: Lyseringsløsning med DTT

Kjemikalier	100 mL	200 mL	300 mL	400 mL	600 mL	Slutt-konsentrasjon
Lyserings stamløsning	89	178 mL	267 mL	356 mL	534 mL	
Destillert vann	10	20 mL	30 mL	40 mL	60 mL	
Triton X-100	1	2 mL	3 mL	4 mL	6mL	1 %
DTT (154.3 g/mol)	0,155 g	0,309g	0,463g	0,617g	0,926 g	10 mM

100 ml lyseringsløsning for to filmer.

Løsning B: Lyseringsløsning med LIS

Kjemikalier	100 mL	200 mL	300 mL	400 mL	600 mL	Slutt-konsentrasjon
1 M Tris pH 7.6 (stamløsning)						
LIS (395,85 g/mol)	0,158 g	0,317 g	0,475 g	0,633 g	0,950 g	4mM

1 M Tris stamløsning fortynnes 10x. 200 ml løsning B for fire filmer. For eksempel hvis en skal ha 200 ml, så brukes 20 ml Tris stamløsning og 180 ml destillert vann. Det er viktig å justere pH til 7,6 etter tilsatt LIS (ved LIS tilsetning synker pH). Man bør ikke tilsette alt destillert vann med det samme, det er viktig å justere pH først så tilsette resten av destillert vann, slik at sluttvolumet blir riktig.

Elektroforesebuffer (stamløsning)

Kjemikalier	100 mL	445 mL
Destillert vann	78 mL	350 mL
NaCl (58.44 g/mol)	16,41 g	73,05 g
NaOH (40.0g/mol)	12,00 g	53,4 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O (372.2 g/mol)	4,18 g	18,61 g
Trizma base (121.2 g/mol)	0,13 g	0,61 g

Kan oppbevares ved romtemperatur, så en kan blande ut ønsket volum, pH justeres til 13,2 med NaOH/HCl ved bruk.

TE buffer (til avlesning)

Kjemikalier	1 L	Sluttkonsentrasjon
0,5 M Tris-HCl (pH 8)	20 mL	10 mM
0,5 M EDTA (pH 8)	2 mL	1 mM
ddH ₂ O	Juster til pH 8, og fyll opp til 1L	

1 M Tris pH 7,6 (stamløsning)

Trizma HCl 121,2 gram/liter

Trizma Base 27,8 gram/liter

Løses i 1liter destillert vann, pH 7,6 ved 25°C.

1,7 % agaroseløsning (stamløsning)

700 gram softagar (lavt smeltepunkt)

41,17 ml 10mM EDTA-løsning

Agarpulver løses i PBS løsningen med EDTA i mikrobølgeovnen, og deles i små begerglass, max ~10 ml per begerglass (avhenger forsøk som skal kjøres). Agarløsningen oppbevares ved 4°C, og smeltes (en gang) enten i mikrobølgeovnen eller på varmeblokk (37°C) ved bruk, det som blir igjen skal kastes.

SYBR®Gold (Farging)

25 ml TE-buffer

20 µL SYBR®Gold (allikotert)

Dette er nok for farging av en film

B. In vitro fertilisering og immunfarging**Trombin**

Et rør trombin fra Sigma-Aldrich tilsettes:

1 ml destillert vann slik at sluttkonsentrasjonen blir 250 U/ml

1,5 ml KSOM slik at slutt konsentrasjonen blir 100 U/ml

Allokerte 100 ul per eppendorfrør

Fibrinogen

Fordelte ca. 5 mg i eppendorfrør som ble laget ved -20 °C. Før bruk ble fibrinogenen løst i KSOM-medium til 5mg/500 µl.

1 % BSA til immunfargingsprosedyre

1 gram BSA i 100 ml PBS.

2,5 % BSA til immunfargingsprosedyre

2,5 gram BSA i 100 ml PBS.

20 % BSA til immunfargingsprosedyre

20 gram BSA i 100 ml PBS

PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) til hunnmus

Øker antall modne follikler i ovariene. PMS leveres som tørrstoff (frysetørret, som regel 1000 IU/glass).

Løses i 1 ml sterilt vann (1000 IU/ml) og deretter 1 ml PBS. Hormonløsningen (500 IU/ml, stamløsning) fordeles deretter i rør a 100 µl. Stamsløsningen lagres i frys ved -20 °C, holdbar i minimum en måned. Før injeksjon fortynnes stamløsning i PBS til bruksløsning: 50 IU/ml. Dosering: 0,1 ml/mus, IP.

HCG (Human Chorionic Gonadotropin) til hunnmus

Induserer egglosning. HCG leveres som tørrstoff (frysetørret, som regel 1000 IU/glass). Løses i 1 ml sterilt vann (1000 IU/ml) og deretter i 1ml PBS. Hormonløsningen (500 IU/ml, stamløsning) fordeles deretter i rør a 100 µl. Stamsløsningen lagres i frys ved -20 °C (holdbar i minimum en måned). Før injeksjon fortynnes stamløsning i PBS til bruksløsning: 50 IU/ml. Stoffet injiseres 42-48 timer etter PMSG. Dosering: 0,1 ml/mus, IP.

C. SCSA**Akridinorange (AO) stamløsning, 1.0 mg/ml**

Vei opp mellom 3 og 6 mg AO i et telleglass

Tilsett dd-H₂O slik at det blir en 1.0 mg/ml løsning

Pakk telleglasset i sølvfolie for å beskytte mot lys og noter dato.

Kan oppbevares ved 4 °C i flere måneder.

Syre-detergent-løsning, pH 1.2 [0,08 N HCl, 0.15M NaCl, 0,1 % Triton-X 100]

Tilsett ca. 300 ml dd-H₂O i et 500 ml begerglass

Tilsett 4.39 mg NaCl

Tilsett 0,5 ml Triton X-100 med pipette med bred tipp på grunn av viskositet, sørg for å få med alt Triton X-100

Tilsett forsiktig 20 ml 2.0 N HCl

Fyll opp til 500 ml med dd-H₂O

Juster forsiktig pH til 1,2 med 5 M HCl og hell over på glassflaske med kork

Kan oppbevares ved 4 °C i flere måneder.

0,2 M Na₂PO₄ buffer (natriumfosfatbuffer)

Vei opp 28.4 g dibasisk natriumfosfat i et 1L begerglass

Fyll opp til 1 L med dd-H₂O

Bland godt og hell over på glassflaske med kork

Kan oppbevares ved 4 °C i flere måneder.

Fargebuffer, pH 6.0 [0.1 M sitronsyrebuffer, 0.2 M Na₂PO₄, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl]

Mål opp 370 ml 0,1 M sitronsyrebuffer i en 1 liter glassflaske.

Tilsett 630 ml 0,2 M Na₂PO₄ buffer (husk å løse opp saltkrystaller, se under)

Legg merke til at når 0,2 M Na₂PO₄ buffer tas ut fra kjøleskapet kan det dannes saltkrystaller. Da kan dette oppvarmes i 37 °C, vannbad helt til saltkrystallene er helt oppløst.

Vei opp 372 mg EDTA (disodium) og 8.77 g NaCl og tilsett i løsningen beskrevet over.

Miks over natt på magnetrører for at EDTA skal løses helt

Juster forsiktig til pH 6,0 med NaOH krystaller, disse kan deles i mindre biter ved hjelp av en skarp kniv.

Kan oppbevares ved 4 °C i flere måneder.

0,1 M sitronsyrebuffer

Vei opp 21,01 g sitronsyre monohydrat i et 1L begerglass

Fyll opp til 1 L med dd-H₂O

Bland godt og hell over på glassflaske med kork

Kan oppbevares ved 4 °C i flere måneder.

AO fargeløsning

Tilsett 600 ml AO stamløsning til 100 ml fargebuffer i et mørkt/foliekledd glass

Kan oppbevares ved 4 °C inntil 2 uker.

AO ekvibreringsvæske

Tilsett 400 ml syre-detergent-løsning i et flowcytometer prøverør

Tilsett 1,20 ml AO fargeløsning.

TNE buffer, 10X, pH 7.4

Vei opp nøyaktig og overfør til en flaske (750-1000 ml)

– 9.48 g Tris-HCl

– 52.6 g NaCl

– 2.23 g EDTA (disodium)

Tilsett 600 ml dd-H₂O

Bland og juster pH til 7.4 med 2 N NaOH

Kan oppbevares ved 4 °C inntil 1 år.

TNE buffer, 1X, pH 7.4, bruksløsning [0,01 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA]

60 ml av 10X TNE-løsningen i en flaske (750-1000 ml)

Fyll opp til 600 ml med dd-H₂O

Sjekk at pH er 7,4

Kan oppbevares ved 4 °C i flere måneder.